



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

**RESISTENCIA A HERBICIDAS EN POBLACIONES DEL GÉNERO *Amaranthus*:
MECANISMOS MOLECULARES Y EXPRESIÓN DE ALELOS *als* RESISTENTES
EN PLANTAS DE *A. thaliana* Y TRIGO**

ALVARO SANTIAGO LARRAN

Licenciado en Biotecnología

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTOR: Dr. HUGO RAÚL PERMINGEAT

CO-DIRECTOR: Dr. JUAN PABLO AMELIO ORTIZ

2018

**RESISTENCIA A HERBICIDAS EN POBLACIONES DEL GÉNERO *Amaranthus*:
MECANISMOS MOLECULARES Y EXPRESIÓN DE ALELOS *als* RESISTENTES
EN PLANTAS DE *A. thaliana* Y TRIGO**

Alvaro Santiago Larran

Licenciado en biotecnología – Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNR y algunos experimentos llevados a cabo en la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign (EEUU), durante el período comprendido entre abril del 2014 y noviembre del 2018, bajo la dirección del Dr. Hugo R. Permingeat y la co-dirección del Dr. Juan Pablo A. Ortiz.

Alvaro S. Larran

-Tesista-

Hugo R. Permingeat

-Director-

Juan Pablo A. Ortiz

-Co-Director-

Defendida: _____

AGRADECIMIENTOS

A Hugo, mi director, por abrirme las puertas de este hermoso lugar. Gracias por guiarme, por escuchar mis propuestas y por darme la libertad que forjó al profesional que hoy me siento.

A Juan, mi co-director, por su apoyo incondicional y por todos los momentos compartidos dentro y fuera del trabajo.

A Vale Perotti, por sus incontables enseñanzas. Por la pasión, la tenacidad y la generosidad con la que nos enseña a hacer ciencia. Gracias por ser nuestra guía.

A mis amigos pipeteadores, Caro, Vale Jr., Andre, Cele, Mariano, Lucas, Nico, Lui, Alber, Agos, Vale Mom, Mari y Lu, por convertirse en mi familia durante estos años fabulosos. Por compartir, por escuchar, por contener, por sonreír. Gracias por llegar para quedarse.

A Silvina, Juli, Lore, Lucas L. y al resto de los integrantes del laboratorio que oficiaron como formadores desde los comienzos. Gracias por todas las enseñanzas, la buena onda y la predisposición.

A Mari y a Vir, por su apoyo incondicional desde el inicio hasta el final. Gracias por compartir este tramo conmigo y enseñarme tantísimas cosas.

A Tuty, mi compañera de vida. Gracias por el apoyo incondicional, por escucharme, aconsejarme, incentivarme y, sobre todo, por darme esa dosis de realismo que hace falta cuando el árbol parece tapar al bosque.

A mis viejos, Gabi y Carlos. A mis hermanos, Pame y Gon. Por ser los primeros en confiar en mí. Por brindarme su amor incondicional y por tener las palabras justas para alentarme a volar. Por hacerme saber que son siempre el lugar al que quiero volver.

A Alber, Flor, Pablo, Andrés, Chino y Juli, mis amigos de la facu. La vida nos lleva por caminos diferentes, pero siempre los llevo conmigo.

A mis amigos y colegas de Biología, los de antes y los de ahora. Gracias por compartir todos estos años de trabajo y por generar los espacios para cuestionar, incansablemente, el quehacer docente.

A mis amigos de Corral, por suerte muchos para nombrarlos. Por ser mi más fiel conexión con el mundo no académico. Gracias por demostrarme que hay amistades que trascienden el tiempo y el espacio.

A la comisión Fulbright y al Ministerio de Educación y Deportes de la Nación, por darme la posibilidad de vivir la experiencia más desafiante y enriquecedora de mi vida. Por permitirme hacer realidad un sueño. Gracias por recompensar a los jóvenes científicos por un poco de todo el esfuerzo que esta carrera conlleva.

Al Dr. Patrick Tranel por abrirme las puertas de su laboratorio. Gracias a la personas con la que compartí mis días en EEUU: Fede, Seba, Maru, Darci, Brent, Kathryn, Ahmed, Ana, Cope, Lynn, Sam. Gracias por aportarle tanta humanidad y calidez a esta experiencia.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNR y al CONICET. Por el sustento institucional, económico y edilicio que todo tesista necesita para desarrollar su trabajo de tesis.

Por último, a Alexandra Elbakyan, creadora del proyecto Sci-Hub, por dar un gran salto en la democratización del conocimiento científico. El curso de esta tesis hubiese sido muy diferente sin la continua contribución de su desarrollo.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Artículos en revistas con referato

Larran AS, Palmieri VE, Perotti VE, Lieber L, Tuesca D, Permingeat HR (2017) Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Amaranthus palmeri* from Argentina. *Pest Management Science* 73, 2578-2584.

Larran AS, Lorenzetti F, Tuesca D, Perotti VE, Permingeat HR (2018) Molecular mechanisms endowing cross resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Amaranthus hybridus* from Argentina. *Plant Molecular Biology Reporter* 36, 907-912.

Murphy BP¹, **Larran AS**¹, Ackley B, Loux M, Tranel PJ (2018) Survey of Glyphosate-, Atrazine- and Lactofen-Resistance Mechanisms in Ohio Waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) populations. *Weed Science*. En prensa. Artículo WS-D-18-00115R2.

Perotti VE¹, **Larran AS**¹, Palmieri VE, Martinatto AK, Tuesca D, Permingeat HR (2018) A novel triple amino acid substitution in the EPSPS found in a high-level glyphosate resistant *Amaranthus hybridus* population from Argentina. *Pest Management Science*.
Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.5303>

Presentaciones en congresos nacionales e internacionales

Larran, Alvaro; Palmieri, Valeria; Perotti, Valeria; Tuesca, Daniel; Permingeat, Hugo. Estudio de los mecanismos de resistencia a glifosato en dos poblaciones de *Amaranthus palmeri* de Argentina con resistencia múltiple. XX Congreso y XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Facultad de Ciencias Médicas, Rosario, 26-27 Nov. 2018.

Larran, Alvaro; Palmieri, Valeria; Martinatto, Andrea; Permingeat, Hugo; Perotti, Valeria. Extracción de adn de semilla única y estudio de la frecuencia de una triple mutación en el gen de la epsps de *A. hybridus* mediante HRMA (High Resolution

Melting Analysis). XX Congreso y XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Facultad de Ciencias Médicas, Rosario, 26-27 Nov. **2018**.

Larran, Alvaro, Murphy, Brent; Tranel, Patrick. “Estudios moleculares de la resistencia a glifosato, atrazina y lactofen en poblaciones de *Amaranthus tuberculatus* del estado de Ohio”. II Congreso Argentino de Malezas de la Asociación Argentina de Ciencia de las Malezas (ASACIM), Rosario, 5 y 6 Jun. **2018**.

Larran, Alvaro; Lorenzetti, Florencia, Tuesca, Daniel; Perotti, Valeria; Permingeat, Hugo. “Mecanismos moleculares de la resistencia cruzada a inhibidores de la acetolactato sintasa (*als*) en poblaciones de *Amaranthus quitensis* de Argentina”. II Congreso Argentino de Malezas de la Asociación Argentina de Ciencia de las Malezas (ASACIM), Rosario, 5 y 6 Jun. **2018**.

Perotti, Valeria; **Larran, Alvaro**; Palmieri, Valeria; Tuesca, Daniel; Permingeat, Hugo. “Exploración del mecanismo de resistencia a glifosato en una subpoblación de *Amaranthus hybridus* de la provincia de Córdoba”. II Congreso Argentino de Malezas de la Asociación Argentina de Ciencia de las Malezas (ASACIM), Rosario, 5 y 6 Jun. **2018**.

Murphy, Brent; **Larran, Alvaro**; Ackley, Bruce; Loux, Mark; Tranel, Patrick. “Molecular Survey of Glyphosate and PPO-Inhibitor Resistance Mechanisms in Ohio Tall Waterhemp Populations”. 72nd Annual Meeting North Central Weed Science Society (NCWSS). St. Louis, Missouri, USA, 4-7 Dic. **2017**.

Larran, Alvaro; Permingeat, Hugo. “Construcción de vectores de expresión con nuevos genes selectores para eventos de co-transformación en trigo”. XIX Congreso y XXXVII Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario. Zavalla, Santa Fe, 28 y 29 Nov. **2017**. ISSN: 2314-1484.

Larran, Alvaro; Palmieri, Valeria; Perotti, Valeria; Lieber, Lucas; Tuesca, Daniel; Permingeat, Hugo. “Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Amaranthus*

palmeri from Argentina”. Plant Sciences Symposium 2017, University of Illinois. Urbana-Champaign, USA, 30 Sep. 2017.

Larran, Alvaro; Lieber, Lucas; Permingeat, Hugo Raúl. “Transformación de *Arabidopsis thaliana* con una versión mutada del gen de la acetolactato sintasa (*als*). XVIII Congreso y XXXVI Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Santa Fe, 5 y 6 Dic. 2016.

Larran Alvaro, Perotti Valeria, Permingeat Hugo Raúl. “In plate selection of resistant plants and measurement of *in vitro* acetolactate synthase activity of an *Amaranthus palmeri* biotype carrying W574L substitution”. XXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Corrientes, 13-16 Nov. 2016. ISBN: 978-987-3619-17-5 1.

Larran, Alvaro; Lieber, Lucas; Permingeat, Hugo Raúl. “Expresión de una versión mutada del gen de la acetolactato sintasa (*als*) en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*”. I Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias. Rosario, 22 y 23 Sep. 2016. ISBN: 978-987-4055-04-0.

Larran, Alvaro; Lieber, Lucas; Lorenzetti, Florencia; Montero Bulacio, Nicolás; Tuesca, Daniel; Permingeat Hugo Raúl. “Bases moleculares de la resistencia cruzada de *Amaranthus palmeri* a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS)”. XVII Congreso XXXV Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Santa Fe, 30 Nov. y 1 Dic. 2015.

Larran, Alvaro; Lieber, Lucas; Lorenzetti, Florencia; Montero Bulacio, Nicolás; Tuesca, Daniel; Permingeat Hugo Raúl. “Molecular Basis for the Resistance to ALS-Inhibiting Herbicides in *Amaranthus palmeri*”. 11th International Congress of Plant Molecular Biology (IPMB), Bourbon Cataratas Convention & Spa Resort, Iguazú Falls, Brazil, 25-30 Oct. 2015.

Artículos de divulgación científica

Larran AS, Perotti VE, Palmieri VE, Permingeat HR (2017) Rápido método de selección de plantas resistentes a herbicidas. *Agromensajes* 48, 18-20.

Perotti VE, **Larran AS**, Palmieri VE, Tuesca D, Permingeat HR (2018) Una triple mutación en la secuencia de la enzima blanco del glifosato es responsable de la resistencia de una población de yuyo colorado (*Amaranthus hybridus*) de la provincia de Córdoba. Blog de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario. Disponible en: <https://fcagr.unr.edu.ar/?p=13192>.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VIII
RESUMEN.....	X
ABSTRACT	XII
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 ¿Qué son las malezas?.....	1
1.2 ¿Cómo evoluciona la resistencia a herbicidas en las malezas?	2
1.3 ¿Dónde actúan los herbicidas?	5
1.4 ¿Cómo actúan los herbicidas?	7
1.4.1 Barreras que atraviesa un herbicida y mecanismos de resistencia	7
1.4.2 Historia y prevalencia de los mecanismos de resistencia.....	9
1.4.3 Herbicidas inhibidores de la EPSPS.....	12
1.4.4 Herbicidas inhibidores de la ALS	15
1.4.5 Herbicidas inhibidores de la PPO.....	19
1.4.6 Herbicidas inhibidores del fotosistema II.....	23
1.5 ¿Cuán importante es el problema de las malezas resistentes a herbicidas en Argentina?	25
1.5.1 Contexto general	25
1.5.2 El género <i>Amaranthus</i>	26
1.6 ¿Puede superarse la resistencia a herbicidas?.....	29
1.7 ¿Qué herramientas puede aportar el conocimiento científico?.....	33
Objetivo general	37
Hipótesis general	37
2. CAPÍTULO 1: ESTUDIO DE LAS BASES BIOQUÍMICAS DE LA RESISTENCIA A INHIBIDORES DE LA ALS Y GLIFOSATO EN POBLACIONES DE <i>Amaranthus palmeri</i> RECIENTEMENTE DETECTADAS EN ARGENTINA	39
2.1 INTRODUCCIÓN	40
Objetivo.....	42
Hipótesis de trabajo.....	42
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	43
2.2.1 Recolección del material vegetal.....	43
2.2.2 Ensayos dosis-respuesta <i>in vivo</i>	43
2.2.3 Estudio de los mecanismos de resistencia a inhibidores de la ALS	45
2.2.3.1 Ensayos de actividad enzimática <i>in vitro</i>	45

2.2.3.2 Clonado y secuenciación del gen <i>als</i>	46
2.2.3.3 Análisis de las secuencias	47
2.2.4 Estudio de los mecanismos de resistencia a glifosato	48
2.2.4.1 Búsqueda de sustituciones en la prolina 106.....	48
2.2.4.2 Secuenciación parcial del gen <i>epsps</i>	49
2.2.4.3 Número relativo de copias del gen <i>epsps</i>	49
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
2.3.1 Resistencia a inhibidores de la ALS.....	51
2.3.1.1 Ensayos dosis-respuesta <i>in vivo</i>	51
2.3.1.2 Ensayos de actividad enzimática <i>in vitro</i>	54
2.3.1.3 Mecanismos moleculares de la resistencia a inhibidores de la ALS	57
2.3.2 Resistencia a glifosato	60
2.3.2.1 Ensayos dosis-respuesta <i>in vivo</i>	60
2.3.2.2 Mecanismos moleculares de la resistencia a glifosato	61
2.4 CONCLUSIONES	65
3. CAPÍTULO 2: ESTUDIO DE LAS BASES BIOQUÍMICAS DE LA RESISTENCIA A INHIBIDORES DE LA ALS Y GLIFOSATO EN POBLACIONES DE <i>Amaranthus hybridus</i> DE ARGENTINA	68
3.1 INTRODUCCIÓN	68
Objetivo.....	69
Hipótesis de trabajo.....	69
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	70
3.2.1 Recolección del material vegetal y tratamiento con herbicidas	70
3.2.2 Mecanismos moleculares de la resistencia a inhibidores de la ALS	71
3.2.2.1 Clonado y secuenciación del gen <i>als</i>	71
3.2.3 Estudio de la resistencia a glifosato	71
3.2.3.1 Ensayo de acumulación de shikimato	71
3.2.3.2 Secuenciación parcial del gen <i>epsps</i>	72
3.2.3.3 Búsqueda de sustituciones en la Prolina 106.....	72
3.2.3.4 Número relativo de copias del gen <i>epsps</i>	72
3.2.3.5 Extracción de ARN y síntesis de ADN copia.....	72
3.2.3.6 Estudio de los niveles de expresión del gen <i>epsps</i>	73
3.2.3.7 Extracción de ADN genómico de semilla única.....	73
3.2.3.8 Análisis de alta resolución de curvas de fusión.....	74
3.2.3.9 Análisis estructural de la mutante TAP-IVS	75
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	76

3.3.1 Resistencia a inhibidores de la ALS.....	76
3.3.2 Resistencia a glifosato.....	81
3.3.2.1 Niveles de resistencia a glifosato en la población R-CA	81
3.3.2.2 Acumulación de shikimato.....	82
3.3.2.3 Análisis de la secuencia <i>epsps</i> de las plantas R-CA ₁	83
3.3.2.4 Amplificación del gen <i>epsps</i>	86
3.3.2.5 Frecuencia de la sustitución TAP-IVS en la población R-CA	87
3.3.2.6 Modelado estructural de la versión TAP-IVS de la EPSPS	91
3.4 CONCLUSIONES	94
4. CAPÍTULO 3: PREVALENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA A GLIFOSATO, LACTOFEN Y ATRAZINA EN 22 POBLACIONES DE <i>Amaranthus tuberculatus</i> DEL ESTADO DE OHIO, ESTADOS UNIDOS.....	97
4.1 INTRODUCCIÓN	97
Objetivos	99
Hipótesis de trabajo.....	99
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	100
4.2.1 Recolección del material vegetal y condiciones de crecimiento.....	100
4.2.2 Tratamientos con herbicidas.....	100
4.2.3 Extracciones de ADN.....	101
4.2.4 Estudio de los mecanismos moleculares de la resistencia.....	101
4.2.4.1 Amplificación en el gen <i>epsps</i>	101
4.2.4.2 Sustituciones en la P106 de la EPSPS.....	102
4.2.4.3 Deleción de la G210 del gen de la PPO	102
4.2.4.4 Sustitución de la R98 de la PPO.....	103
4.2.4.5 Sustitución de la S264 de la proteína D1	103
4.2.4.6 Mapas de distribución	103
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	105
4.3.1 Resistencia a glifosato.....	105
4.3.2 Resistencia a lactofen.....	107
4.3.3 Resistencia a atrazina	109
4.3.4 Análisis integrado y perspectivas	111
4.4 CONCLUSIONES	112
5. CAPÍTULO 4: EXPRESIÓN DE ALELOS <i>als</i> RESISTENTES EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>Arabidopsis thaliana</i> Y TRIGO	115
5.1 INTRODUCCIÓN	115
Objetivo.....	117

Hipótesis de trabajo	117
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	119
5.2.1 Construcción de vectores de expresión para <i>Arabidopsis thaliana</i>	119
5.2.2 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y de <i>Arabidopsis thaliana</i>	120
5.2.3 Selección y chequeo de las transformantes	121
5.2.4 Evaluación de la resistencia en las plantas transgénicas	122
5.2.4.1 Niveles de expresión del transgén	122
5.2.4.2 Actividad ALS.....	122
5.2.4.3 Crecimiento en medios suplementados con inhibidores de la ALS	123
5.2.4.4 Curvas dosis-respuesta por riego.....	123
5.2.5 Construcción de vectores pMF6als para expresión en trigo.....	124
5.2.6 Construcción de curvas de selección con imazetapir en cultivo <i>in vitro</i> de trigo	124
5.2.7 Transformación y selección <i>in vitro</i> de trigo transgénico	125
5.2.7.1 Pretratamiento de los explantos.....	125
5.2.7.2 Preparación de las micropartículas recubiertas con ADN	126
5.2.7.3 Bombardeo con acelerador de micropartículas	126
5.2.7.4 Selección de los explantos transgénicos.....	128
5.2.7.5 Confirmación de transgénesis	128
5.3 RESULTADOS	130
5.3.1 Construcción de vectores de expresión para <i>A. thaliana</i>	130
5.3.2 Selección de plantas de <i>A. thaliana</i> transgénicas	131
5.3.3 Análisis de la resistencia en las líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	133
5.3.3.1 Niveles de expresión	133
5.3.3.2 Niveles de resistencia	134
5.3.4 Construcción de vectores pMF6als para expresión en trigo.....	138
5.3.5 Construcción de curvas de selección con imazetapir en cultivo <i>in vitro</i> de trigo	139
5.3.6 Selección de callos transgénicos de trigo	141
5.4 CONCLUSIONES	145
6. DISCUSIÓN GENERAL	146
7. CONCLUSIONES GENERALES	148
8. BIBLIOGRAFÍA	151

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I	Clasificación de los herbicidas por modos de acción de acuerdo al HRAC	7
Figura II	Etapas en la acción de un herbicida y mecanismos de resistencia	8
Figura III	Reacción catalizada por la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS)	13
Figura IV	Participación de la acetolactato sintasa (ALS) en la vía de síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada	17
Figura V	Participación de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO) en la vía de síntesis del grupo hemo y clorofila	21
Figura VI	Esquema del fotosistema II (PSII) en la membrana tilacoide	23
Figura VII	Distribución de poblaciones resistentes a glifosato de <i>A. hybridus</i> y <i>A. palmeri</i> en Argentina	28
Figura VIII	Esquema cronológico-metodológico convencional para el estudio de la resistencia a herbicidas	36
Figura 1	Localización de los oligonucleótidos utilizados dentro del marco abierto de lectura del gen <i>als</i> de <i>A. palmeri</i>	47
Figura 2	Curvas dosis-respuesta <i>in vivo</i> con inhibidores de la ALS en <i>A. palmeri</i>	53
Figura 3	Germinación y selección en placa de plantas resistentes de <i>A. palmeri</i>	55
Figura 4	Curvas de actividad enzimática <i>in vitro</i> con inhibidores de la ALS sobre extractos crudos de hoja de <i>A. palmeri</i>	56
Figura 5	Apilamiento consenso de nucleótidos y de aminoácidos entre las secuencias de las poblaciones R y r de <i>A. palmeri</i>	59
Figura 6	Curvas dosis-respuesta <i>in-vivo</i> con glifosato en <i>A. palmeri</i> .	60
Figura 7	Ensayo dCAPS desarrollado para sustituciones en la P106 de la EPSPS de <i>A. palmeri</i> .	62
Figura 8	Alineamiento de las secuencias parciales del gen <i>epsps</i> de <i>A. palmeri</i>	63
Figura 9	Estudio del mecanismo de amplificación del gen <i>epsps</i> en <i>A. palmeri</i>	64
Figura 10	Alineamientos nucleotídicos y aminoacídicos de las secuencias correspondientes a la ALS en <i>A. hybridus</i>	78
Figura 11	Localización de las poblaciones de <i>A. hybridus</i> estudiadas y distribución de los mecanismos de resistencia a inhibidores de la ALS en Argentina	80
Figura 12	Respuesta al glifosato de plantas de las poblaciones S-HU y R-CA de <i>A. hybridus</i> .	81
Figura 13	Ensayo de dosis-respuesta a glifosato en <i>A. hybridus</i>	82

Figura 14	Acumulación de shikimato en hojas de plantas S-HU y R-CA ₁ de <i>A. hybridus</i>	83
Figura 15	Secuenciación parcial del gen <i>epsps</i> y genotipado por dCAPS en <i>A. hybridus</i>	85
Figura 16	Estudio del mecanismo de amplificación del gen <i>epsps</i> en <i>A. hybridus</i>	86
Figura 17	Análisis de alta resolución de las curvas de fusión para la detección de la triple sustitución TAP-IVS en la EPSPS	88
Figura 18	Pasos para la clasificación genotípica de las muestras de la población R-CA	89
Figura 19	Modelado estructural de las variantes EPSPS wt, TIPS y TAP-IVS	93
Figura 20	Distribución de la resistencia a glifosato en las poblaciones de <i>A. tuberculatus</i> de Ohio	106
Figura 21	Distribución de la resistencia a lactofen en las poblaciones de <i>A. tuberculatus</i> de Ohio	109
Figura 22	Distribución de la resistencia a atrazina en las poblaciones de <i>A. tuberculatus</i> de Ohio	110
Figura 23	Acelerador de micropartículas Biomics	127
Figura 24	Construcción de los vectores pZAVals	131
Figura 25	Selección de eventos transgénicos de <i>A. thaliana</i>	133
Figura 26	Expresión relativa del transgén <i>als</i> en las líneas de <i>A. thaliana</i> seleccionadas	134
Figura 27	Resistencia a inhibidores de la ALS en las líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	136
Figura 28	Ensayo dosis-respuesta por riego con herbicidas	137
Figura 29	Construcción de vectores pMF6als	139
Figura 30	Etapas del cultivo <i>in vitro</i> de trigo	140
Figura 31	Escala de clasificación de los callos de trigo en las etapas de inducción y regeneración	141
Figura 32	Embriogénesis somática a partir de callos de trigo bombardeados con las distintas versiones alélicas del gen <i>als</i> subclonado en el vector pMF6	143
Figura 33	Confirmación de la transgénesis en trigo	144

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I	Modo de acción de los herbicidas según HRAC	6
Tabla II	Malezas resistentes a herbicidas en Argentina	26
Tabla 1	Poblaciones de <i>A. palmeri</i> estudiadas	43
Tabla 2	Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR	47
Tabla 3	Parámetros de las curvas dosis-respuesta para inhibidores de la ALS en <i>A. palmeri</i>	52
Tabla 4	Parámetros de las curvas de actividad ALS en <i>A. palmeri</i>	54
Tabla 5	Sustituciones detectadas en el marco abierto de lectura de la ALS de <i>A. palmeri</i>	58
Tabla 6	Parámetros de las curvas de dosis-respuesta para glifosato en <i>A. palmeri</i>	61
Tabla 7	Mecanismos moleculares de la resistencia a glifosato en <i>A. palmeri</i>	62
Tabla 8	Poblaciones de <i>A. hybridus</i> estudiadas	70
Tabla 9	Sustituciones encontradas en el marco abierto de lectura de la ALS de las poblaciones resistentes de <i>A. hybridus</i>	79
Tabla 10	Parámetros de la curva dosis-respuesta a glifosato en <i>A. hybridus</i>	82
Tabla 11	Valores de GR ₅₀ y/o DL ₅₀ para las especies de malezas resistentes a glifosato caracterizadas a nivel molecular hasta el momento	91
Tabla 12	Localización y supervivencia de las poblaciones de Ohio a lactofen, atrazina y glifosato	105
Tabla 13	Mecanismos de resistencia a glifosato en <i>A. tuberculatus</i>	107
Tabla 14	Mecanismos de resistencia a lactofen en <i>A. tuberculatus</i>	108
Tabla 15	Mecanismos de resistencia a atrazina en <i>A. tuberculatus</i>	110
Tabla 16	Porcentaje de plantas T2 transgénicas sobrevivientes a aplicaciones de glufosinato de amonio 300 µM	132
Tabla 17	Registro de los niveles de inducción y regeneración de embriones de trigo creciendo en medios de cultivo selectivos	141

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- ΔG210:** Deleción de la glicina 210 de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO)
- A264S:** Sustitución de la alanina 264 de la proteína D1 por serina
- A282D:** Sustitución de la alanina 282 de la acetolactato sintasa (ALS) por aspartato
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ADNc:** Ácido desoxirribonucleico copia
- ALS:** Acetolactato sintasa
- ARN:** Ácido ribonucleico
- D376E:** Sustitución del aspartato 376 de la ALS por glutamato
- dCAPS:** derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, digestión diferencial de secuencias polimórficas amplificadas
- DL₅₀:** Dosis letal 50, dosis letal media
- dNTPs:** Desoxinucleótidos trifosfato
- EPSPS:** 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa
- FR:** Factor de resistencia
- g:** gravedad, unidad de aceleración
- G210:** Glicina en la posición 210 de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO)
- GM:** Genéticamente modificado
- GR₅₀:** Growth Rate 50, inhibición del crecimiento media
- GST:** Glutación S-transferasa
- H₂O_d:** Agua destilada
- HRAC:** Herbicide Resistance Action Comitee, comité de acción para la resistencia a herbicidas
- HRMA:** High Resolution Melting Analysis, análisis de alta resolución de curvas de fusión
- I₅₀:** Concentración de herbicida que inhibe un 50% la actividad enzimática
- i.a.:** ingrediente activo
- IMI:** Imidazolinonas
- IVS:** Isoleucina102+Valina103+Serina106 en la secuencia de la EPSPS
- LB:** Luria-Bertani
- M601I:** Sustitución de la metionina 601 de la ALS por isoleucina
- MgCl₂:** Cloruro de magnesio
- MoA:** Modo de acción

MS: Murashige-Skoog

NaCl: Cloruro de sodio

P106: Prolina en la posición 106 de la EPSPS

P106S: Sustitución de la prolina 106 de la EPSPS por serina

PCR: Polymerase Chain Reaction, reacción en cadena de la polimerasa

PEP: Fosfoenolpiruvato

PQ: Plastoquinona

PPO: Protoporfirinógeno oxidasa

psi: pounds-force per square inch, libra por pulgada cuadrada (medida de presión)

PSII: Photosystem II, fotosistema II

PTB: Pirimidiniltiobenzoatos

qPCR: quantitative PCR, PCR cuantitativa en tiempo real

R²: Coeficiente de determinación

R98: Arginina en la posición 98 de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO)

RG: Resistencia a glifosato

RH: Resistencia a herbicidas

RNT: Resistencia no target

RT: Resistencia target

S653N: Sustitución de la serina 653 de la ALS por asparagina

SCT: Sulfonilaminocarbonil triazolinonas

SU: Sulfonilureas

TAP: Treonina102+Alanina103+Prolina106 en la secuencia de la EPSPS

TAP-IVS: Triple sustitución T102I+A103V+P106S en la secuencia de la EPSPS

TIPS: Doble sustitución T102I+P106S en la secuencia de la EPSPS

TP: Triazolopirimidinas

U/mg: Unidades por miligramo

W574L: Sustitución del triptofano 574 de la ALS por leucina

wt: wild type, salvaje

RESUMEN

RESISTENCIA A HERBICIDAS EN POBLACIONES DEL GÉNERO *Amaranthus*: MECANISMOS MOLECULARES Y EXPRESIÓN DE ALELOS *als* RESISTENTES EN PLANTAS DE *A. thaliana* Y TRIGO

En los agroecosistemas, las malezas son plantas que crecen en un cultivo y que no corresponden a la especie o al genotipo cultivado, lo cual usualmente provoca pérdidas en el rendimiento de la producción de dicho cultivo. El control químico de las malezas se realiza por medio de la aplicación de herbicidas y constituye una de las principales herramientas en la agricultura moderna. El sistema agro-productivo nacional está basado desde hace más de 20 años en el cultivo de soja transgénica resistente a glifosato (ya sea en monocultivo, o bien, en rotación con maíz resistente) junto con la aplicación del herbicida glifosato, o mezclas del mismo con otras clases de herbicidas. La confianza excesiva en este sistema ha llevado a un problema grave relacionado a la evolución de malezas resistentes a herbicidas y a la incesante búsqueda de estrategias químicas alternativas que complementen las ya existentes.

El primer caso de resistencia a herbicidas en Argentina fue detectado en 1996, y al día de la fecha existen 15 especies diferentes que han desarrollado resistencia al menos a un herbicida, ascendiendo este número a 255 especies a nivel mundial. Entre ellas, se destacan las especies del género *Amaranthus*, cuyo éxito radica en sus capacidades de crecimiento, desarrollo y reproducción. Son plantas de metabolismo C4 anuales que emergen después de las heladas de primavera, crecen rápidamente, compiten agresivamente con los cultivos de verano, toleran la sequía, responden a los altos niveles de nutrientes disponibles y están adaptadas para evitar sombras a través de una rápida elongación del tallo. Adicionalmente, presentan una gran variabilidad genética y una inusitadamente alta producción de semillas, que pueden distribuirse y germinar muy eficientemente. El objetivo de esta tesis doctoral consistió en dilucidar las bases moleculares de la resistencia a herbicidas en poblaciones del género *Amaranthus*, de manera de contribuir al diseño racional de estrategias de control y, eventualmente, al desarrollo de herramientas biotecnológicas.

Como resultado de extensas investigaciones a nivel fenotípico y molecular, se pudo confirmar la resistencia cruzada a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) en poblaciones de *Amaranthus palmeri* y *Amaranthus hybridus* -las dos malezas más

problemáticas de Argentina- y develar que la resistencia está causada por mutaciones asociadas al sitio de acción que provocan cambios conformacionales responsables de una resistencia de amplio espectro a todos los inhibidores de la ALS (D376E y W574L).

En lo que respecta al glifosato, una de las poblaciones de *A. hybridus* presentó valores de resistencia extraordinariamente elevados comparados a los casos previamente descriptos. Curiosamente, se pudo asociar este fenotipo de resistencia a un mecanismo de acción completamente novedoso: una triple sustitución aminoacídica en la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Como consecuencia de estos estudios pudieron desarrollarse técnicas que posibilitan la rápida detección de este nuevo mecanismo de resistencia, denominado TAP-IVS, en un alto número de individuos en simultáneo. Por su parte, las poblaciones de *A. palmeri* resistentes a glifosato presentaron una alta prevalencia de la sustitución P106S en la EPSPS, y una incipiente amplificación en el gen *epsps*.

Del mismo modo, se comprobó que la resistencia a herbicidas en *A. tuberculatus* del estado de Ohio (EEUU) es un problema radicado, existiendo una dominancia de la resistencia a glifosato, pero habiéndose detectado niveles mensurables de resistencia a lactofen (inhibidor de la protoporfironógeno oxidasa, PPO) y atrazina (inhibidor del Fotosistema II). Los mecanismos moleculares dominantes fueron la amplificación génica para glifosato y la delección de la glicina 210 de la PPO para lactofen. No se detectaron mecanismos asociados al sitio de acción en el caso de la resistencia a atrazina.

Por último, fue posible el desarrollo de un gen marcador de selección para la transformación de trigo basado en una versión alélica *als* que codifica para la sustitución en la posición 574, plausible de utilizarse con diferentes principios activos debido al amplio espectro de resistencia otorgado por el gen. La rápida evolución de múltiples mecanismos de resistencia en las últimas décadas, ha reafirmado la necesidad de adoptar estrategias de manejo integradas. La información de los mecanismos moleculares generada resulta clave para el diseño de tácticas de control geo-localizadas que permitan a los productores entender, prevenir y eventualmente sobrellevar de manera sustentable el problema de resistencia en malezas, sin contribuir a la generación de un problema similar a largo plazo.

Palabras clave: *Amaranthus palmeri*; *Amaranthus hybridus*; *Amaranthus tuberculatus*; resistencia a glifosato; inhibidores de la PPO; inhibidores de la ALS; EPSPS; transformación de trigo.

ABSTRACT

HERBICIDE RESISTANCE IN *Amaranthus* spp: MOLECULAR MECHANISMS AND EXPRESSION OF *als* RESISTANT ALLELES IN *A. thaliana* AND WHEAT

The first case of herbicide resistance in Argentina was detected in *Amaranthus hybridus* in 1996 and, to date, 15 different species have evolved resistance to at least one herbicide. Moreover, several populations of *Amaranthus palmeri* (a non-native species) with suspected cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides and glyphosate have been repeatedly detected by farmers since 2013. Despite this, no extensive reports of the molecular mechanisms endowing resistance in local *Amaranthus* species were published in the last decades. The goal of this doctoral thesis was to elucidate the molecular bases of herbicide resistance in problematic populations within the *Amaranthus* gender, contributing to the rational design of management strategies and, eventually, to the development of biotechnological tools.

The cross-resistance to ALS inhibitors was confirmed in populations of *A. palmeri* and *A. hybridus*, the two most problematic weeds in Argentina. It was possible to reveal that resistance was caused by target-site mutations (D376E and W574L) that cause conformational changes responsible for a broad spectrum of resistance to all ALS inhibitors families.

Moreover, one of the *A. hybridus* populations also displayed an extraordinarily high level of glyphosate resistance. Interestingly, this phenotype could be associated to a completely novel target-site mechanism: a triple amino acid substitution in the EPSPS protein (TAP-IVS), the target of glyphosate. As a consequence of these studies, some techniques that enable a rapid detection of this new resistance mechanism in a high number of individuals were developed. On the other hand, populations of *A. palmeri* displaying glyphosate resistance presented a high prevalence of the P106S substitution in the EPSPS, and low levels of *epsp*s gene amplification as an emergent mechanism.

Additionally, it was found that herbicide resistance in *A. tuberculatus* of the Ohio state (USA) is a serious problem, with a strong dominance of glyphosate resistance, but still measurable levels of lactofen and atrazine resistance. Gene amplification and G210 deletion were found to be the most frequent mechanisms for glyphosate and lactofen resistance, respectively.

Finally, it was possible to develop a selectable marker for wheat transformation based on an *als* allelic version carrying the W574L substitution, allowing the possibility of rotating different active ingredients as selection agents.

The rapid evolution of multiple mechanisms of resistance in the last decades has reinforced the need to integrate conventional weed management strategies to non-chemical tactics. Information provided by the molecular mechanisms is key in the design of geo-specific control strategies that allow producers to understand, prevent and eventually cope the problem of herbicide resistant weeds in a sustainable way.

Keywords: *Amaranthus palmeri*; *Amaranthus hybridus*; *Amaranthus tuberculatus*; glyphosate resistance; PPO inhibitors; ALS inhibitors; EPSPS; biolistic wheat transformation.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 ¿Qué son las malezas?

Se conoce como “malezas” a aquellas plantas que, a modo general, interfieren con la actividad humana tanto en áreas cultivadas como no cultivadas. En los agroecosistemas, las malezas son plantas que crecen en un cultivo y que no corresponden a la especie o al genotipo cultivado.

Además de competir con los cultivos por los nutrientes, el agua del suelo y la luz, las malezas hospedan insectos y microorganismos que pueden transmitir enfermedades, y los exudados de sus raíces y/o filtraciones de las hojas pueden directamente resultar tóxicos para las plantas cultivadas. Las malezas interfieren con la cosecha del cultivo, incrementando los costos de tales operaciones y contaminando la producción. Consecuentemente, la presencia de estas plantas en las áreas cultivadas reduce la eficiencia de los insumos tales como el fertilizante y el agua de riego, favorecen la presencia de otros organismos y plagas y, finalmente, reducen severamente el rendimiento y la calidad del cultivo (Labrada et al., 1994).

Las prácticas agrícolas necesarias para eliminar las malezas que crecen en las áreas sembradas con cultivos han evolucionado conjuntamente con los sistemas de producción de granos. Las formas de labranza históricamente representaron una parte importante de la producción agrícola; siendo su principal objetivo la preparación del suelo para facilitar la siembra. Además, la preparación de la tierra era considerada necesaria para obtener un cultivo uniforme, sin interferencias de las malezas (Perez, 2005).

Sin embargo, las prácticas de labranza contribuían en gran medida a la erosión y al desgaste de los suelos haciendo que los mismos pierdan sus nutrientes y se vuelvan menos fértiles. A finales de la década de 1980, se fue generando un nuevo concepto cuya base era la incorporación de prácticas agronómicas conservacionistas en los sistemas de producción. En esa década comenzó a adoptarse el método de siembra directa (una forma de agricultura de conservación, labranza mínima o labranza cero), el cual consiste en un sistema integral de producción de granos que evolucionó hacia la implantación del cultivo sin remoción del suelo y con una cobertura permanente del mismo con residuos de cosecha (Pognolote et al., 2011).

La adopción de la siembra directa derivó en un sistema productivo más sustentable, ya que entre sus beneficios se encuentran el de mejorar el aprovechamiento del agua, proteger al suelo contra la erosión, mejorar el balance de materia orgánica, permitir sembrar donde arar

no era posible por falta de agua, prolongar el ciclo agrícola, ahorrar en el uso de combustibles y emisiones contaminantes debido a una menor cantidad de maquinaria utilizada y aumentar el rendimiento de los cultivos (Pognolote et al., 2011; Trigo, 2011). Sin embargo, la expansión de la siembra directa en la agricultura se debe, en parte, a la adopción de herbicidas de amplio espectro y al desarrollo de cultivos transgénicos resistentes a esos herbicidas en la década del 90 (Vencill et al., 2012).

Las malezas pueden ser controladas en forma mecánica, cultural, biológica o química. Cualquier método de control genera, inicialmente, un disturbio en la comunidad de malezas, provocando modificaciones en su composición y en su estructura funcional. Dentro de la diversidad de individuos que la conforman, tendrán mayores chances de sobrevivir aquellos que manifiesten características de adaptación al propio disturbio (Swanton et al., 1993; Clements et al., 1994). Así, estas plantas contribuirán en mayor medida a la generación siguiente y la frecuencia de los caracteres que otorgan aquellas ventajas adaptativas se incrementará en las generaciones subsiguientes (Silvertown y Charlestown, 2001). Eventualmente, la aplicación repetida de un mismo disturbio podría generar una abundancia tan elevada de los individuos adaptados que dicho método de control podría volverse ineficaz sobre la nueva comunidad de malezas (Harker y Clayton, 2004).

El control químico de las malezas se realiza por medio de la aplicación de herbicidas y ha llegado a convertirse en la principal herramienta en todos los programas de manejo de malezas de la agricultura actual (Anderson, 1996; Owen, 2016). El uso extensivo de herbicidas en la agricultura se debe a que son productos altamente fiables y eficaces, de fácil manejo y económicamente rentables. Además, son agronómicamente versátiles, es decir, ofrecen al agricultor la posibilidad de elegir cuándo y cómo controlar el problema de las malezas, permitiendo un margen de uso que va desde la presembrado hasta la postemergencia tardía y diversas opciones de tratamiento en cada cultivo (Bastida y Menéndez, 2001).

1.2 ¿Cómo evoluciona la resistencia a herbicidas en las malezas?

Las malezas pueden ser tolerantes o adquirir resistencia a un herbicida particular, por lo cual resulta relevante diferenciar estos dos conceptos que muy frecuentemente son confundidos. La tolerancia es la capacidad natural y heredable que tienen todos los individuos de una especie de soportar la dosis de uso de un herbicida debido a características morfológicas y/o fisiológicas que le son propias; por lo tanto, las poblaciones tolerantes a un

herbicida nunca fueron susceptibles (Papa, 2002). La resistencia, en cambio, es la capacidad natural y heredable de un subgrupo de individuos dentro de una población de una especie de no ser controlada por un herbicida que con anterioridad le afectaba intensamente (WSSA, 1998). Así, la resistencia representa una capacidad adquirida de sobrevivir y reproducirse frente a la acción fitotóxica de un herbicida.

Teniendo en cuenta estas definiciones, la aplicación repetida de un mismo principio activo (o de principios activos con el mismo modo de acción, como se detalla en la sección 1.3) podría seleccionar positivamente a todos los individuos de una especie que por sus características biológicas presentan baja sensibilidad a ese herbicida, enriqueciendo a la comunidad con esa especie tolerante (Radosevich et al., 2007). Por otro lado, este mismo método de control podría favorecer la supervivencia de un número de individuos de una población de otra especie que presentan ciertos caracteres y así, contribuir a la disminución de la eficacia del método por un aumento sucesivo de la frecuencia de estos individuos resistentes al herbicida (Gresel y Segel, 1978).

El uso de herbicidas ha sido la herramienta principal utilizada para el control de malezas en todo el mundo desde finales de los años sesenta. Sin embargo, el uso continuo del mismo herbicida o la aplicación de herbicidas con el mismo modo de acción (MoA) inevitablemente condujo a la selección de poblaciones de malezas resistentes (Shaner, 2014). Durante las últimas dos décadas, la adopción extensiva de cultivos transgénicos tolerantes a herbicidas como el glifosato llevó a la industria agroquímica a invertir menos en el desarrollo de nuevos principios activos, particularmente aquellos con nuevos modos de acción. La rápida eficacia combinada con la simplicidad de operación de estos sistemas resultó en el uso excesivo de un pequeño número de herbicidas, favoreciendo la evolución de las malezas resistentes.

Son muchos los factores que influyen en el proceso de evolución de la resistencia y, a grandes rasgos, pueden clasificarse en dos grupos: los factores antropológicos y los factores biológicos.

Los factores antropológicos son aquellos relacionados con las intervenciones humanas y las prácticas agronómicas seleccionadas para el manejo de malezas. Estos incluyen la elección de diferentes herbicidas, su frecuencia de utilización y las dosis de aplicación en el campo. Así, la estructura química de cada principio activo, su analogía con otros herbicidas y su acción residual, modulan la probabilidad con que los genes de resistencia incrementan su

frecuencia, porque son aspectos condicionantes de la presión de selección (Tranel y Wright, 2002). La rotación de herbicidas de igual modo de acción favorece la selección de plantas resistentes (Holt y Le Baron, 1990), al igual que la utilización de herbicidas con elevada actividad residual (Le Baron y McFarland, 1990). Otros factores de manejo agronómico como el uso de prácticas alternativas de control de malezas, rotación de cultivos y principios activos y alternancia en las prácticas de labranza son aspectos de considerable importancia (Cardina et al., 2002).

Los factores biológicos, por su parte, incluyen la ecología, la genética, la historia de cada especie de maleza y el mecanismo de resistencia involucrado. Así, la frecuencia, el número y la dominancia de los caracteres de resistencia pre-existentes a la aplicación de un herbicida serán factores condicionantes en el tiempo requerido para que una población resulte en un nuevo caso de resistencia. Además, los costos biológicos o efectos de estos caracteres sobre la capacidad reproductiva de la especie tendrán inherentemente un impacto en la tasa de evolución de la resistencia, dada la menor habilidad competitiva de las plantas resistentes en ausencia de la presión de selección (Neve et al., 2003). Por último, ciertos factores biológicos como el porcentaje de autogamia y alogamia, la producción de semillas y su longevidad en el suelo, el éxito del flujo génico por dispersión de semillas y polen, tienen una incidencia directa en la dispersión de los alelos causantes de la resistencia (Jasieniuk et al., 1996; Busi et al., 2008).

En Argentina, el sistema agro-productivo está basado desde hace más de 20 años en el cultivo de soja transgénica resistente a glifosato (ya sea en monocultivo, o bien, en una rotación con maíz transgénico tolerante) junto con la aplicación del herbicida glifosato, en algunos casos mezclado con otra clase de herbicidas. La confianza excesiva en este sistema ha llevado a un problema grave relacionado a la evolución de malezas resistentes a herbicidas. Si bien el primer caso de resistencia a herbicidas en el país fue detectado en 1996 (Tuesca y Nisensohn, 2001), al día de la fecha existen 15 especies que han desarrollado resistencia al menos a un herbicida, y este número asciende a 255 especies a nivel mundial (Heap, 2019).

Así, la resistencia a herbicidas en malezas es hoy uno de los problemas más importantes que enfrentan los sistemas agropecuarios en todo el mundo (Heap, 2014). La rápida evolución de múltiples mecanismos de resistencia en las últimas décadas tiene un impacto tanto en la producción de cultivos como en el medio ambiente, y representa un gran desafío para los agricultores, los científicos y el sector de la agroindustria. Este fenómeno

reafirma la necesidad de aumentar el conocimiento sobre los procesos que modulan la resistencia y de adoptar estrategias de manejo integradas que no se basen sólo en el control químico.

1.3 ¿Dónde actúan los herbicidas?

Los herbicidas son productos químicos que inhiben o interrumpen el crecimiento y desarrollo de una planta. Los mismos poseen una afinidad muy específica por ciertas proteínas con función enzimática localizadas en distintas regiones subcelulares. Generalmente, la afinidad está dada por la similitud estructural y química que existe entre el sustrato natural de la enzima y el herbicida. Mediante la unión al sitio activo de la enzima o a regiones cercanas al mismo, los herbicidas imposibilitan que el sustrato natural de la enzima haga lo mismo y la consecuencia inmediata es la inhibición del proceso metabólico mediado por dicha enzima.

Existen diversos criterios para clasificar a los herbicidas. Por su espectro de acción, pueden ser clasificados en selectivos (eliminan algunas plantas sin dañar significativamente a otras) o en no selectivos (son fitotóxicos para todas las especies vegetales). Por su momento de aplicación, pueden clasificarse en preemergentes (antes de que emerja el cultivo, pudiendo en algunos casos utilizarse inclusive en presembrado) o postemergentes (luego de la emergencia del cultivo). Por su movilidad dentro de la planta, pueden clasificarse en herbicidas sistémicos (son absorbidos y transportados a toda la planta vía xilema y/o floema) o de contacto (tienen un transporte limitado y solo dañan las partes de la planta con las que entraron en contacto). Por su persistencia, pueden ser clasificados como residuales (tienen una acción prolongada por permanecer un tiempo considerable en el medio ambiente) o no residuales (son rápidamente degradados). Pueden ser clasificados por su modo de acción, haciendo referencia al proceso bioquímico que se ve afectado por el herbicida. Y por último, también pueden clasificarse de acuerdo a su familia química, es decir, de acuerdo a propiedades químicas similares y usualmente el mismo modo de acción.

En el contexto de la resistencia a herbicidas, la clasificación por MoA resulta una de las más relevantes debido a que es la que mejor describe cómo los herbicidas imponen la presión de selección sobre las malezas y su conocimiento tiene una utilidad directa en las estrategias de control (Vencill, 2012).

La Tabla I muestra la clasificación de los herbicidas por modo de acción según el Comité de Acción para la Resistencia a Herbicidas (HRAC, por su sigla en inglés) y la Figura I esquematiza el sitio celular de acción de cada grupo. Actualmente existen 25 modos de acción diferentes para los más de 200 herbicidas disponibles (algunos cuyo sitio de acción es desconocido). Los más utilizados corresponden a los grupos A, B, C y G y encabezan el listado de número de especies que han desarrollado resistencia a los mismos (Heap, 2019).

Tabla I. Modo de acción de los herbicidas según el comité de acción para la resistencia a herbicidas (HRAC). Tabla adaptada de Délye et al., 2013.

Grupo	Modo(s) de acción	Gen codificante de la enzima blanco	Vía afectada
A	Inhibición de la acetil-CoA carboxilasa (ACCase)	Nuclear	Biosíntesis de ácidos grasos
B	Inhibición de la acetolactato sintasa (ALS)	Nuclear	Biosíntesis de aminoácidos (Leu, Ile, Val)
C	Inhibición de la proteína D1 del fotosistema II	Cloroplástico	Fotosíntesis (transferencia de electrones)
D	Desvío de los electrones transferidos por la ferredoxina del fotosistema I	Cloroplástico	Fotosíntesis (transferencia de electrones)
E	Inhibición de la Protoporfirinógeno Oxidasa (PPO)	Nuclear	Fotosíntesis (biosíntesis del grupo hemo)
F	Inhibición de la fitoeno desaturasa (PDS), la hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD) o de una proteína desconocida	Nuclear	Fotosíntesis (biosíntesis de carotenoides)
G	Inhibición de la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS)	Nuclear	Biosíntesis de aminoácidos (Phe, Trp, Tyr)
H	Inhibición de la glutamina sintasa	Nuclear	Biosíntesis de aminoácidos (Gln)
I	Inhibición de la dihidropterato sintasa	Nuclear	Biosíntesis de tetrahidrofolato
K1, K2	Aumento de la depolimerización de tubulina	Nuclear	Polimerización de microtúbulos
K3	Inhibición de la ácido graso sintasa (FAS)	Nuclear	Biosíntesis de ácidos grasos
L	Inhibición de la celulosa sintasa	Nuclear	Biosíntesis de pared celular
M	Desacople de la fosforilación oxidativa	-	Biosíntesis de ATP
N	Inhibición de la ácido graso elongasa	Nuclear	Biosíntesis de ácidos grasos
O	Estimulación de la proteína 1 de respuesta al inhibidor de transporte (TIR1)	Nuclear	Regulación de los genes de respuesta a auxina
P	Inhibición del transporte de auxinas	Desconocido	Señalización hormonal de largo alcance
Z	Desconocido	-	

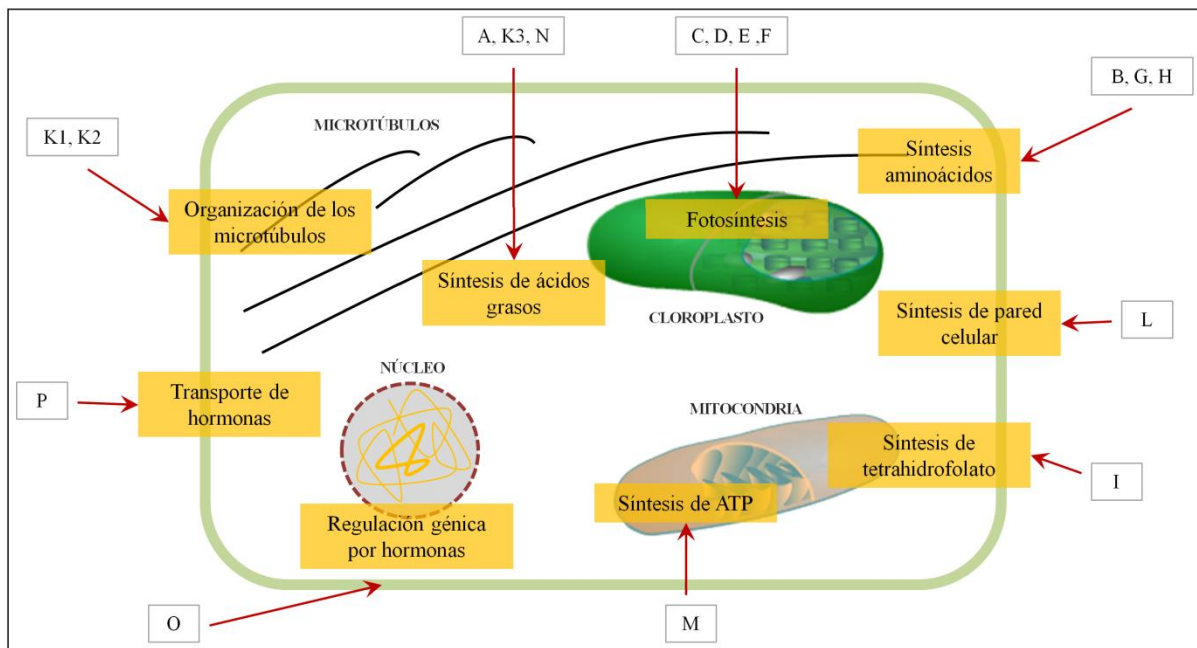


Figura I. Procesos celulares afectados por los herbicidas y clasificación por modos de acción de acuerdo al HRAC. Imagen adaptada de Délye et al., 2013.

1.4 ¿Cómo actúan los herbicidas?

1.4.1 Barreras que atraviesa un herbicida y mecanismos de resistencia

Las malezas resistentes pueden sobrevivir a la aplicación de herbicidas a través de una variedad de mecanismos que se pueden dividir en dos categorías amplias: los mecanismos asociados al sitio de acción y los mecanismos no asociados al sitio de acción. La resistencia asociada al sitio de acción (o resistencia *target*, RT) ocurre cuando los herbicidas alcanzan el sitio de acción a una dosis letal, pero hay cambios en el mismo que limitan el impacto del herbicida; mientras que la resistencia no asociada al sitio de acción (o resistencia *no target*, RNT) implica mecanismos que minimizan la cantidad de herbicida activo que llega al sitio de acción, o bien protegen contra daños derivados de la acción del herbicida (Délye et al., 2013; Délye et al., 2015; Powles y Yu, 2010). A diferencia de la RT, se sabe poco de los mecanismos que producen RNT, pero parece ser una respuesta adaptativa más general al uso de herbicidas (Délye et al., 2013).

La Figura II esquematiza los pasos consecutivos que atraviesa un herbicida hasta llegar a su sitio de acción. Luego de su aplicación, las moléculas del herbicida penetran en la

planta (1), son translocadas al lugar donde se encuentra la proteína blanco (2), se acumulan en dicho lugar (3), se unen a la proteína blanco (4) y, finalmente, interrumpen estructuras o procesos celulares vitales (5). Por lo general, la inhibición de vías metabólicas esenciales deriva en la producción de especies reactivas del oxígeno que dañan las células y, en última instancia, causan la muerte de la planta.

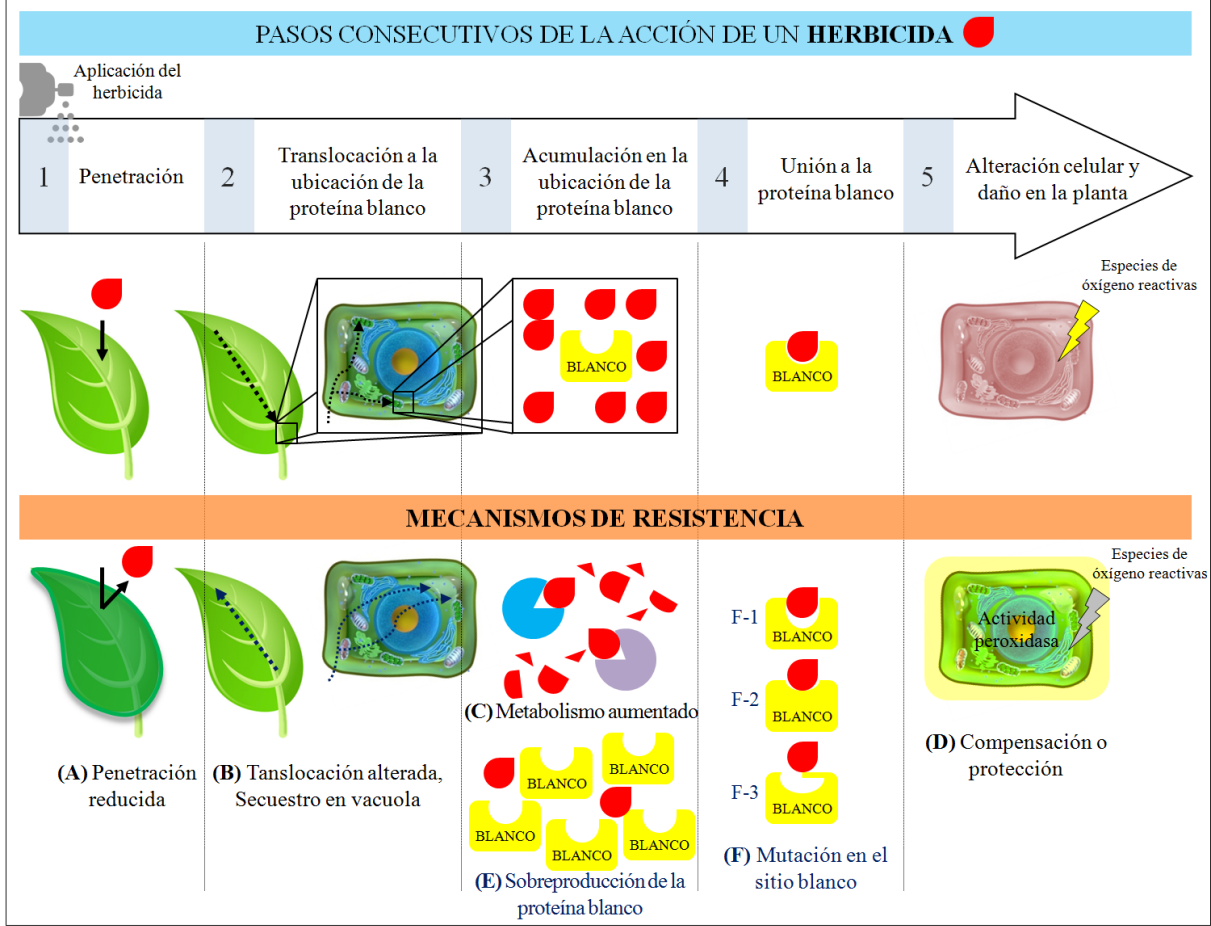


Figura II. La acción de los herbicidas seguida de su aplicación (superior) y los mecanismos de resistencia identificados en malezas (inferior). Los mecanismos no asociados al sitio de acción se encuentran escritos en color negro (A, B, C y D), mientras que aquellos asociados al sitio de acción se encuentran escritos en color azul (E y F). Figura adaptada de Délye et al., 2013.

Son muchos los mecanismos de resistencia que han evolucionado en las malezas. En el caso de la RNT, los mecanismos incluyen: una reducción en la penetración del herbicida por alteraciones en las propiedades de la cutícula o en los hábitos de la planta (A), una translocación reducida del herbicida hacia el sitio blanco (B), una degradación metabólica aumentada del herbicida (C), o una neutralización aumentada de moléculas citotóxicas generadas por la acción del herbicida (D). En el caso de la RT, los mecanismos incluyen: una

sobreprroducción de la proteína blanco por mutaciones en regiones regulatorias o por amplificación génica (E), y/o mutaciones estructurales que modifican la organización tridimensional y las propiedades electroquímicas de la proteína blanco (F). Estas modificaciones estructurales podrían no afectar la afinidad de unión del herbicida (F-1), reducirla (F-2) o bloquearla (F-3) (Délye et al., 2013).

La magnitud de la reducción en la afinidad de un herbicida por su sitio de unión depende del cambio estructural en la proteína blanco. Dependiendo del herbicida, un dado cambio estructural en la proteína puede conferir alta o moderada resistencia, o, en raras ocasiones, un incremento en la sensibilidad al herbicida. Este tipo de alteraciones permiten que la planta se vuelva resistente pero, a veces, pueden provocar un costo en la actividad de la enzima y así disminuir la tasa de crecimiento de la planta (Délye et al., 2013).

Para aquellas malezas que presentan resistencia a más de un herbicida, se han establecido algunas clasificaciones que dependen de los mecanismos implicados. Si la resistencia a más de un principio activo está causada por más de un mecanismo, se toma el concepto de “resistencia múltiple” (Patzoldt y Tranel, 2007; Yu et al., 2007), mientras que si un solo mecanismo es responsable de dicho fenotipo, se la llama “resistencia cruzada”. Esta última frecuentemente involucra a herbicidas con el mismo modo de acción (Hall et al., 1997).

1.4.2 Historia y prevalencia de los mecanismos de resistencia

Los mecanismos de RT fueron los primeros en ser dilucidados. El primer caso de RT se notificó en una población de *Senecio vulgaris* L. que mostró resistencia a atrazina y simazina, herbicidas pertenecientes al grupo C (Ryan, 1970). Sin embargo, no fue hasta la década de 1980 que los casos de resistencia a herbicidas se volvieron masivos, principalmente a los inhibidores de la acetil-Coenzima A carboxilasa (ACCase) (Grupo A) y a los inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) (Grupo B) (Shaner, 1992).

La resistencia a los inhibidores de la ACCase y la ALS reportadas resultaron estar causadas por mutaciones en el sitio de acción y los rasgos resultaron funcionalmente dominantes. Contrariamente a lo que ocurriría con los mecanismos de RT a triazina (Grupo C), la resistencia a los inhibidores de ACCase y ALS presentaba herencia nuclear, y bajos costos biológicos fueron asociados con estos rasgos de resistencia (Powles y Yu, 2010). En

consecuencia, los casos de resistencia a ambos herbicidas evolucionaron rápidamente en numerosas especies (Kaundun, 2014; Yu y Powles, 2014).

En 1996, los cultivos genéticamente modificados tolerantes a glifosato se introdujeron en América del Norte y del Sur, y poco más tarde en Australia. Casi inmediatamente, se comenzaron a informar algunos casos de malezas con resistencia a glifosato (RG) (Powles, 2008; Heap, 2019). Sin embargo, las mutaciones puntuales de la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS, sitio de acción del glifosato) han sido poco frecuentes y confieren una resistencia débil a dicho herbicida (Sammons y Gaines, 2014). Otro mecanismo de RT, que involucra la sobreexpresión de la EPSPS producida por amplificación génica, se informó en varias malezas con RG (Gaines et al., 2010; Nandula et al., 2014; Salas et al., 2012; Tranel et al., 2011). Más aún, la participación de una amplificación basada en ADN circular extracromosómico se ha propuesto recientemente como el mecanismo presente en una población de *Amaranthus palmeri* de Georgia (Koo et al., 2018). Además, una doble sustitución de aminoácidos en la EPSPS, conocida por conferir altos niveles de resistencia en líneas de maíz transgénicas comerciales, se ha informado en *Eleusine indica* (Yu et al., 2015) y *Bidens pilosa* (Alcántara-de la Cruz et al., 2016a).

Por su parte, aunque el primer caso de RNT se informó en 1957 en una población de zanahoria silvestre (*Daucus carota* L.) resistente a 2,4-D (Switzer, 1957; Whitehead y Switzer, 1967), hasta ahora, sólo unos pocos mecanismos de RNT han sido dilucidados a nivel molecular (Ghanizadeh y Harrington, 2017). Esto se debe a que los procesos bioquímicos que los regulan son intrínsecamente complicados, tienen una naturaleza cuantitativa que está controlada por múltiples genes y la información genómica disponible para las especies de malezas es limitada.

La naturaleza múltiple de los mecanismos de RNT tiene una incidencia directa sobre su evolución, ya que cada gen proporciona una fracción de la resistencia. En otras palabras, cuando un herbicida no logra el control total de las malezas en generaciones sucesivas, los diferentes genes de la RNT podrían contribuir a un aumento de la resistencia a los herbicidas (Manalil, 2014). En las especies alógamas, donde los individuos intercambian y recombinan alelos, el desarrollo de RNT es más rápido que en las especies autógamas. Además, la rapidez con la que se acumulan los alelos de la RNT en una población depende de la diversidad genética inicial y del tamaño de la población, la presión de selección y los costos de resistencia física (Délye, 2013).

La resistencia metabólica (esquemmatizada en la Figura II, inciso C) es uno de los mecanismos de RNT mejores conocidos y generalmente se describe como un proceso de detoxificación vegetal que consta de cuatro fases (Bartholomew et al., 2002; Martinoia et al., 1993). Esta resistencia se ha asociado a niveles aumentados en la actividad del citocromo P-450 y glutatión S-transferasa (GST) en especies de gramíneas como *Alopecurus myosuroides* y *Alopecurus japonicus*, *Lolium rigidum*, *Echinochloa phyllopogon* y *Beckmannia syzigachne*, que mostraron resistencia a una amplia gama de herbicidas (Hall et al., 1997; Chen et al., 2018; Busi et al., 2017; Iwakami et al., 2014; Pan et al., 2016). De manera similar, algunos estudios han confirmado que la resistencia metabólica también puede estar presente en las malezas latifoliadas, aunque han sido sustancialmente menos numerosos (Ma et al., 2013; Oliveira et al., 2018; Figueiredo et al., 2018; Nakka et al., 2017; Torra et al., 2017).

Délye et al. (2013) propusieron que parte de la RNT puede ser constitutiva y otra parte podría ser inducida porque el proceso de detoxificación de la planta se encuentra bajo control genético polialélico. Hasta la fecha no se ha descrito ningún factor de transcripción involucrado en la RNT en las malezas.

Otro mecanismo de RNT es la reducción en la translocación del herbicida (esquemmatizada en la Figura II, inciso B), descrita como una restricción en el movimiento del herbicida dentro de la planta (a través del xilema y/o el floema) y/o la compartimentación del herbicida (secuestro en la pared celular o en la vacuola; exclusión activa de los cloroplastos) (Délye, 2013). En Estados Unidos y en Australia se ha documentado una reducción de la translocación del herbicida a los tejidos meristemáticos en poblaciones resistentes a glifosato de *Conyza canadensis* y *Lolium rigidum*, respectivamente (Feng et al., 2004; Koger y Reddy, 2005; Lorraine-Colwill et al., 2002; Wakelin et al., 2004). Dos estudios recientes informaron la participación de los transportadores ABC en la reducción de la translocación de glifosato en *Conyza canadiensis* (Tani et al., 2015) y 2,4-D en *Raphanus raphanistrum* (Goggin et al., 2016). Sin embargo, todavía no se han identificado alelos involucrados en el proceso.

De esta manera, mientras que los mecanismos de RT evolucionaban y eran detectados fácilmente por los malezólogos y científicos, los alelos de la RNT fueron acumulándose de una forma menos llamativa y mensurable. Así, la historia de la liebre y la tortuga parece tener su versión en el mundo de las resistencias a los herbicidas. Hoy en día, la RNT se considera el tipo predominante de resistencia al primer y tercer grupo de herbicidas más utilizados del mundo (grupos G y A) y al segundo grupo de herbicidas más utilizados del mundo (grupo B)

en malezas gramíneas (Délye et al., 2013). De esta manera, parece que finalmente la tortuga (RNT) está ganándole la carrera a la liebre (RT).

1.4.3 Herbicidas inhibidores de la EPSPS

La enzima 3-fosfoshikimato 1-carboxiviniltransferasa (EC 2.5.1.19), ampliamente conocida bajo su sinónimo 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) constituye el blanco del herbicida glifosato, perteneciente al grupo G. Este grupo, el de las glicinas, sólo incluye al herbicida glifosato.

La EPSPS es una de las enzimas implicadas en la vía de síntesis de los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina, que son necesarios para la síntesis de proteínas que llevan al crecimiento de la planta (Steinrücken y Amrhein, 1980). La EPSPS cataliza el penúltimo paso en la vía del ácido shikímico y está implicada, adicionalmente, en la síntesis de numerosos metabolitos secundarios, incluyendo el tetrahidrofolato, la ubiquinona, y la vitamina K (Gruys y Sikorski, 1999).

La vía del shikimato, completamente ausente en mamíferos, peces, aves, reptiles e insectos, está presente en plantas y microorganismos, y la importancia de la misma se fundamenta en la estimación de que hasta el 35% o más de la biomasa vegetal seca está representada por moléculas aromáticas derivadas de estas vías (Franz et al., 1997).

En plantas, la EPSPS está localizada primariamente en cloroplastos y otros plastidios (Mousdale y Coggin, 1985), aunque se han reportado formas citoplásmicas (Baylis, 2000). La enzima es sintetizada como un precursor citoplasmático con una secuencia N-terminal que codifica para el péptido de tránsito. El péptido de tránsito es requerido para la translocación de la enzima al estroma de los plastidios, donde luego es clivado para dar lugar a la proteína madura (Della-Cioppa et al., 1986). La EPSPS posee un peso molecular de 46 kDa y se pliega en dos dominios similares, cada uno compuesto de tres repeticiones de la unidad de plegamiento $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta$ (Stallings et al., 1991). En cuanto a su secuencia codificante, el gen de la EPSPS en *Amaranthus* spp. parece tener alrededor de 10.229 bp y estar formado por ocho exones y 7 intrones (Gaines et al., 2013), teniendo su secuencia codificante 1554 pb.

La EPSPS cataliza la transferencia de una unidad de enolpiruvil desde el fosfoenolpiruvato (PEP) hacia el shikimato-3-fosfato (S3P), formando los productos 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato (EPSP) y fosfato inorgánico (Figura III). Esta reacción es inusual ya que procede vía clivaje de la unión carbono-oxígeno de PEP, en lugar del clivaje

del enlace fósforo-oxígeno, como ocurre en la mayoría de las enzimas que utilizan PEP (Walsh et al., 1996). La reacción se produce a través de un intermediario tetraédrico formado por S3P y PEP (Anderson y Johnson, 1990).

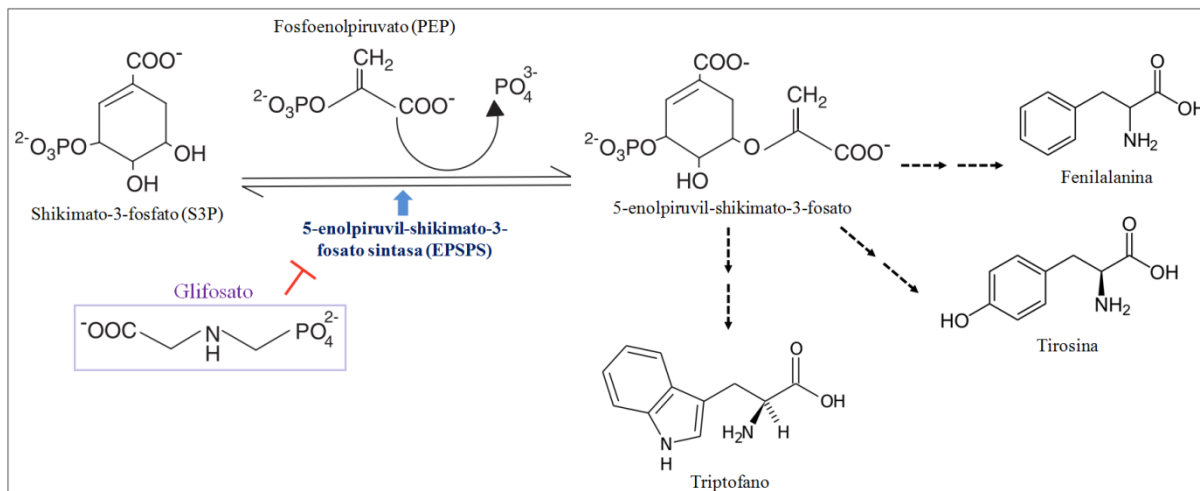


Figura III. Reacción catalizada por la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) y su participación en la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos. En el recuadro en violeta puede observarse la estructura del inhibidor de la EPSPS, el glifosato, y su analogía al sustrato PEP.

El glifosato inhibe a la EPSPS en una reacción lenta y reversible, de manera competitiva para el PEP y no competitiva para el S3P (Boocock y Coggins, 1983; Steinrücken y Amrhein, 1984). La inhibición ocurre a través de la formación de un complejo ternario EPSPS-S3P-glifosato y la unión del glifosato acontece después de la formación del complejo binario EPSPS-S3P (Kishore y Shah, 1988). A pesar de las evidencias que sugieren a la EPSPS como el único sitio de acción del herbicida, la manera exacta por la cual el glifosato provoca la muerte de la planta está aún en discusión (Senseman, 2007).

El glifosato es un herbicida no selectivo, postemergente y sistémico que controla una amplia variedad de especies vegetales. Este potente herbicida es absorbido por las plantas a través del follaje y se traslada en la sección longitudinal de tallos y raíces por vía floemática (Sprankle et al., 1975; Amrhein et al., 1980). Se utiliza ampliamente para el control de malezas perennes con reproducción vegetativa, ya que al ser altamente sistémico se transporta a toda la planta (Rosales-Robles y Sánchez de la Cruz, 2006).

En lo que respecta a su residualidad, la degradación microbiana ha sido considerada como la principal vía de descomposición del herbicida (Souza et al., 1999). La persistencia

del glifosato en el suelo es moderada, ya que se ha determinado que la molécula tiene una vida media de 45-60 días (Wauchope et al., 1992; Vereecken, 2005).

Con la expiración de la patente del glifosato a comienzos de la década de 1990, se favoreció la comercialización de productos genéricos, y por ende se expandió la oferta del herbicida por una abrupta caída del precio del mismo (Woodburn, 2000). Adicionalmente, el desarrollo de los cultivos transgénicos de soja, maíz y algodón tolerantes a glifosato y su masiva adopción a partir de 1996, provocó la disminución en el uso de otros herbicidas comúnmente utilizados.

Así, la diversidad de estrategias para el control de las malezas fue en detrimento, provocando una severa modificación de los agroecosistemas, ya que el glifosato puede ser empleado exitosamente en presembrado y en postemergencia y controla un amplio espectro de malezas (Dill et al., 2010). Sumado a esto, la siembra directa eliminó la labranza del suelo como herramienta mecánica para el control de malezas. La acción conjunta de estos factores determinó que se ejerza una importante presión de selección sobre las comunidades y poblaciones de malezas, dirigida fundamentalmente a especies adaptadas al no laboreo y relativamente tolerantes al glifosato. Este problema afecta especialmente a los cultivos de soja, maíz y algodón de los Estados Unidos, Argentina y Brasil (Duke y Powles, 2009).

Actualmente, la resistencia a este herbicida ha sido confirmada en 42 especies de malezas (Heap, 2019). La primera maleza con RG fue *Conyza canadensis*, reportada en 2001 en campos sembrados con soja en EEUU (VanGessel, 2001). Unos pocos años después de este informe, infectó al menos 2 millones de hectáreas de cultivos GM en los Estados Unidos. Otra especie de importancia por producir grandes pérdidas económicas es *Amaranthus palmeri* que ha surgido de regiones cultivadas con algodón en el sur de Estados Unidos. Desde su hallazgo en 2006 (Culpepper et al., 2006), miles de campos donde se siembra algodón han sido infestados. Otras especies de malezas en las que se han encontrado gran cantidad de biotipos resistentes a glifosato a nivel mundial son: *Alopecurus myosuroides*, *Avena fatua*, *Avena sterellis*, *Echinochloa colona*, *Echinochloa crus-gallis*, *Lolium perenne* ssp. *Multiflorum*, *Lolium rigidum* y *Sorghum halepense* (Heap, 2019).

Dada la naturaleza de inhibidor competitivo del glifosato, que compite por el sitio catalítico de unión a la EPSPS con el fosfoenolpiruvato (PEP), existen pocas mutaciones que confieren resistencia a este compuesto sin afectar al funcionamiento de la enzima. Es decir,

muchas de las mutaciones en esta enzima que le otorgarían a la planta resistencia al glifosato podrían resultar letales para ella.

Como se describe detalladamente en la sección 2.1, son escasos los reportes de mecanismos de RT producidos por mutaciones en el gen *epsps*, y ocurren sobre todo en las posiciones 106 y 102 de la EPSPS, siendo mucho más frecuente otro mecanismo de RT asociado a la amplificación génica y ciertos mecanismos de RNT (Sammons y Gaines, 2014). Se ha reportado una translocación reducida del glifosato como un mecanismo de resistencia común en *Conyza canadensis* y *Lolium rigidum*, proveyendo un alto nivel de resistencia: de 7 a 11 veces mayor de lo que proveen las mutaciones puntuales en la EPSPS (Preston y Wakelin, 2008). Este también es el caso de RG en sorgo de alepo que se ha encontrado en la provincia de Salta en Argentina (Vila-Aiub et al., 2012) y en Estados Unidos (Riar et al., 2011), el cual ha mostrado poseer resistencia debido a una disminución de la translocación del herbicida y una menor absorción por parte de la hoja.

1.4.4 Herbicidas inhibidores de la ALS

La enzima acetolactato sintasa (ALS) o acetohidroxiácido sintasa (AHAS) (EC 2.2.1.6), constituye el blanco de acción de los herbicidas pertenecientes al grupo B. Esta enzima está implicada en la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada: leucina, valina e isoleucina (Devine et al., 1993). Los aminoácidos ramificados son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, por lo que la inhibición de su síntesis resulta letal para muchas especies de vegetales, aunque la secuencia real del proceso fitotóxico se desconoce.

La ALS está involucrada en el primer paso de la biosíntesis de aminoácidos ramificados tanto en plantas como en microorganismos (Subramanian et al., 1990), catalizando dos reacciones en paralelo (Umbarger 1969 y 1978) (Figura IV-A):

- La condensación de dos moléculas de piruvato para dar lugar a una molécula de 2-acetolactato (de allí el nombre de ALS, acetolactato sintasa). Esta vía deriva en la síntesis de los aminoácidos valina y leucina.

- La condensación de una molécula de piruvato y una de 2-cetobutirato para dar lugar a una molécula de 2-aceto-2-hidroxi-3-butenilato (de allí el nombre de AHAS, acetohidroxiácido sintasa). Esta vía deriva en la síntesis de isoleucina.

Dentro de este grupo B se ubican más de 50 herbicidas comerciales que pueden ser agrupados en cinco familias químicas (Figura IV-B): sulfonilureas (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidinas (TP), ácidos pirimidiniltiobenzoicos (PTB) y sulfonilaminocarbonil triazolinonas (SCT). Todos tienen sitios de unión a la ALS que se solapan parcialmente: los herbicidas se unen a la enzima y obstruyen el canal que lleva al sitio activo; lo cual lleva a su inhibición (McCourt et al. 2006; Garcia et al., 2017; Lonhienne et al., 2018).

La ALS pertenece a la superfamilia de las enzimas dependientes de tiamina bifosfato (ThDP). Este cofactor está unido por un ión metálico divalente como Mg^{2+} o Mn^{2+} , que coordina al grupo bifosfato del ThDP y a dos residuos altamente conservados en estas proteínas (Hawkins et al., 1989). La ALS también se une a una molécula de flavina adenina dinucleotido (FAD), aunque este cofactor no participa en las reacciones principales (Chang y Duggleby, 1997). La ALS es inhibida por los productos finales de su vía: valina, leucina e isoleucina. (Mifflin, 1971; Milin y Cave, 1972; Lee y Duggleby, 2002).

La mayoría de las ALS que han sido caracterizadas poseen una subunidad catalítica (aproximadamente 65 kDa) y una subunidad regulatoria menor, que varía su tamaño entre 9 y 54 kDa, dependiendo de la especie de origen. En la ALS de plantas, esta subunidad regulatoria estimula la actividad y confiere sensibilidad a la retroinhibición por los aminoácidos de cadena ramificada (Lee y Duggleby, 2001). McCourt et al. (2006) resolvieron la estructura cristalina de la subunidad catalítica de la ALS de *Arabidopsis thaliana* (denominada AtAHAS), concluyendo que el tetrámero de la AtAHAS consiste en cuatro monómeros idénticos (Muller y Schulz, 1993). Asociado a cada monómero se encuentran los cofactores FAD y Mg-ThDP, y una molécula de SU o IMI cuando estos inhibidores están presentes (McCourt et al., 2005). Los cuatro sitios activos de cada tetrámero se forman en la interfase entre dos monómeros, por lo que el requerimiento mínimo para la actividad de la enzima es un dímero de subunidades catalíticas. La relevancia biológica de los tetrámeros no está clara; pero podrían contribuir a una estabilidad mayor de la enzima o permitir a las subunidades regulatorias unirse más eficientemente (Duggleby et al., 2008).

propusieron que el corte del péptido de tránsito involucra la remoción de los primeros 70-85 aminoácidos, dependiendo de la especie vegetal (Wiersma et al., 1989; Rutledge et al., 1991; Chang y Duggleby, 1997).

Por su parte, los genes codificantes para la ALS de varias especies vegetales han sido clonados y secuenciados. Los primeros dos genes vegetales correspondientes a esta proteína fueron aislados de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum* utilizando el gen de levaduras *ilv2* como sonda heteróloga de hibridación (Mazur et al., 1987). En todas las especies de plantas examinadas, al menos un gen *als* es expresado constitutivamente, aunque su nivel de expresión puede variar entre diferentes tejidos y distintos estadios del desarrollo (Schmitt y Singh, 1990; Ouellet et al., 1992; Keeler et al., 1993). Desde entonces, los genes *als* de decenas de especies han sido clonados y caracterizados. Mientras que algunos organismos presentan una sola isoforma de la ALS (*A. thaliana* y *Xanthium* sp.), otros presentan dos (*N. tabacum* y *Zea mays*) y otros, familias génicas complejas (*Brassica napus* posee cinco genes y *Gossypium hirsutum* posee seis). Un rasgo común a todas es que los genes de las subunidades catalíticas identificadas hasta el momento no contienen intrones (Jones et al., 1985; Bascomb et al., 1987).

Hoy en día, luego del glifosato, los inhibidores de la ALS son de los más utilizados para el manejo de malezas latifoliadas y gramíneas en una gran variedad de cultivos agronómicos. La popularidad de su utilización radica en que son herbicidas que presentan una amplia selectividad de cultivos (por ejemplo, los cereales suelen ser tolerantes a las SU), son eficaces para el control de un gran espectro de malezas a dosis bajas, presentan una muy baja toxicidad en mamíferos y poseen una actividad residual significativa (Saari et al., 1994; Yu y Powles, 2014). La aplicación de estos herbicidas puede realizarse en preemergencia o en postemergencia, ya que son absorbidos por hojas y raíces y transportadas por xilema y floema, aunque el método de aplicación recomendado es específico para cada tipo de herbicida dependiendo de su residualidad (Robles y Esqueda, 2006).

Las primeras malezas reportadas resistente a estos herbicidas fueron *Lolium rigidum* en Australia en 1982 (Heap y Knight, 1986) y *Lactuca serriola* en 1987 en Estados Unidos (Mallory-Smith et al., 1990). Las poblaciones resistentes fueron seleccionadas por las aplicaciones repetidas anuales de esta clase de herbicidas. Hoy en día, representan el grupo con mayor número de especies resistentes, ascendiendo a un total de 160 (Heap, 2019), entre las cuáles se destacan: *Amaranthus palmeri*, *Amaranthus retroflexus*, *Amaranthus*

tuberculatus, *Ambrosia artemisiifolia*, *Avena fatua*, *Conyza canadensis*, *Echinocloa crus-galli*, *Kochia scoparia*, *Lolium perenne* ssp. *multiflorum*, *Lolium rigidum* y *Stellaria media*.

Debido a que los herbicidas inhibidores de la ALS no se unen al sitio catalítico de esta enzima (McCourt et al., 2006), existe una gran variedad de mutaciones potenciales que pueden ocurrir en el gen de la ALS, y por ende una alta frecuencia de aparición de resistencia a estos compuestos químicos (Tranel y Wright, 2002). Las mutaciones reportadas más frecuentemente asociadas a la resistencia ocurren en los siguientes residuos de aminoácidos: Ala 122 (A122), Pro 197 (P197), Ala 205 (A205), Asp 376 (D376), Trp 574 (W574) y Ser 653 (S653). Otras mutaciones que también parecerían conferir resistencia, pero que sólo han sido encontradas en una o pocas especies implican a los aminoácidos: Arg 377, Gly 654, Asp 630, Leu 662, Ser 186, Lis 416, Pro 188 y Gly 95 (Laplanche et al., 2009; Massa et al., 2011; Rajguru et al., 2005; Okuzaki et al., 2007; Siboni et al., 2002; Heap, 2019). Los números corresponden a posiciones aminoacídicas de la secuencia de referencia de *Arabidopsis thaliana*.

Se han observado patrones variables de resistencia cruzada entre diferentes clases de inhibidores de ALS, dependiendo de la posición de la mutación y el aminoácido reemplazado (Shaner, 1999). Generalmente, los patrones de resistencia cruzada asociados a una alteración de la ALS pueden ser clasificados como resistentes a SU y TP, resistentes a IMI y PTB, o resistentes a las cuatro o cinco familias de inhibidores (Tranel y Wright, 2002). Las sustituciones en los aminoácidos A122 o S653 conferirían resistencia a IMI con bajo nivel de resistencia a SU (Bernasconi et al., 1995; Devine y Eberlein, 1997; Patzoldt y Tranel, 2001); en cambio, una sustitución en la P197 otorgaría resistencia a SU pero resistencia cruzada baja o nula a IMI (Guttieri et al., 1992). Las mutaciones en la A205 darían resistencia a cuatro clases de herbicidas, aunque mostrando bajos niveles de resistencia a algunas de ellas (Bernasconi et al., 1995; Woodworth et al., 1996). Por último, el cambio en los aminoácidos W574 y D376 otorgaría resistencia cruzada a las cinco familias de herbicidas de este grupo (Whaley et al., 2007; Beckie y Tardif, 2012).

1.4.5 Herbicidas inhibidores de la PPO

La protoporfirinógeno oxidasa IX (PPO, EC 1.3.3.4) cataliza la oxidación de protoporfirinógeno a protoporfirina IX y es la última enzima común en la vía biosintética del

tetrapirrol que produce hemo y clorofila (Jacobs y Jacobs, 1984; Beale y Weinstein, 1990). En las plantas, la biosíntesis de clorofila tiene lugar exclusivamente en los plastidios, mientras que el hemo se produce tanto en los plastidios como en las mitocondrias (Smith et al., 1993; Chow et al., 1997). Así, existen dos isoformas de la PPO en plantas, ambas de codificación nuclear: PPO1 (cloroplástica y codificada por el gen PPX1) y PPO2 (mitocondrial y codificada por el gen PPX2) (Figura V).

Se ha comprobado que cuando las plantas susceptibles se tratan con inhibidores de la PPO, el sustrato de ésta, protoporfirinógeno IX, se acumula y es exportado desde los orgánulos al citoplasma (Jacobs y Jacobs, 1993). Allí, enzimas con actividad peroxidasa presentes en la membrana plasmática e insensibles al herbicida lo convierten en protoporfirina IX (Lee y Duke, 1994). Este compuesto, caracterizado por ser un pigmento pardo-rojizo altamente fotodinámico, se acumula en el citoplasma y, en presencia de luz, induce la formación de oxígeno singlete produciendo una rápida peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática (Duke et al., 1991). Este modelo se ha resumido esquemáticamente en la Figura V.

Los herbicidas de este grupo (E) pertenecen a siete familias químicas diferentes: difeniléteres, fenilpirazoles, N-fenilftalimidias, tiadiazoles, triazolinonas, oxadiazolas, oxazolidindiona y pirimidindionas. Estos compuestos químicos son absorbidos por el follaje y actúan como herbicidas de contacto, si bien pueden tener una limitada movilidad vía apoplasto (Devine, 2002). Son aplicados generalmente en postemergencia de las malezas, excepto algunos pocos que se pueden aplicar en preemergencia (Arregui y Puricelli, 2008; Duke y Dayan, 2011).

Los herbicidas inhibidores de la PPO controlan básicamente malezas latifoliadas anuales, aunque algunos como el oxadiazón también tienen efecto sobre gramíneas anuales (Grossmann, 2000). Su efecto residual es sustancialmente variable dependiendo del principio activo; mientras que algunos no poseen efecto residual ya que son adsorbidos a la materia orgánica y arcillas del suelo y son sensibles a la descomposición microbiana, otros pueden permanecer activos hasta ocho semanas (Arregui y Puricelli, 2008; Oliveira et al., 2011).

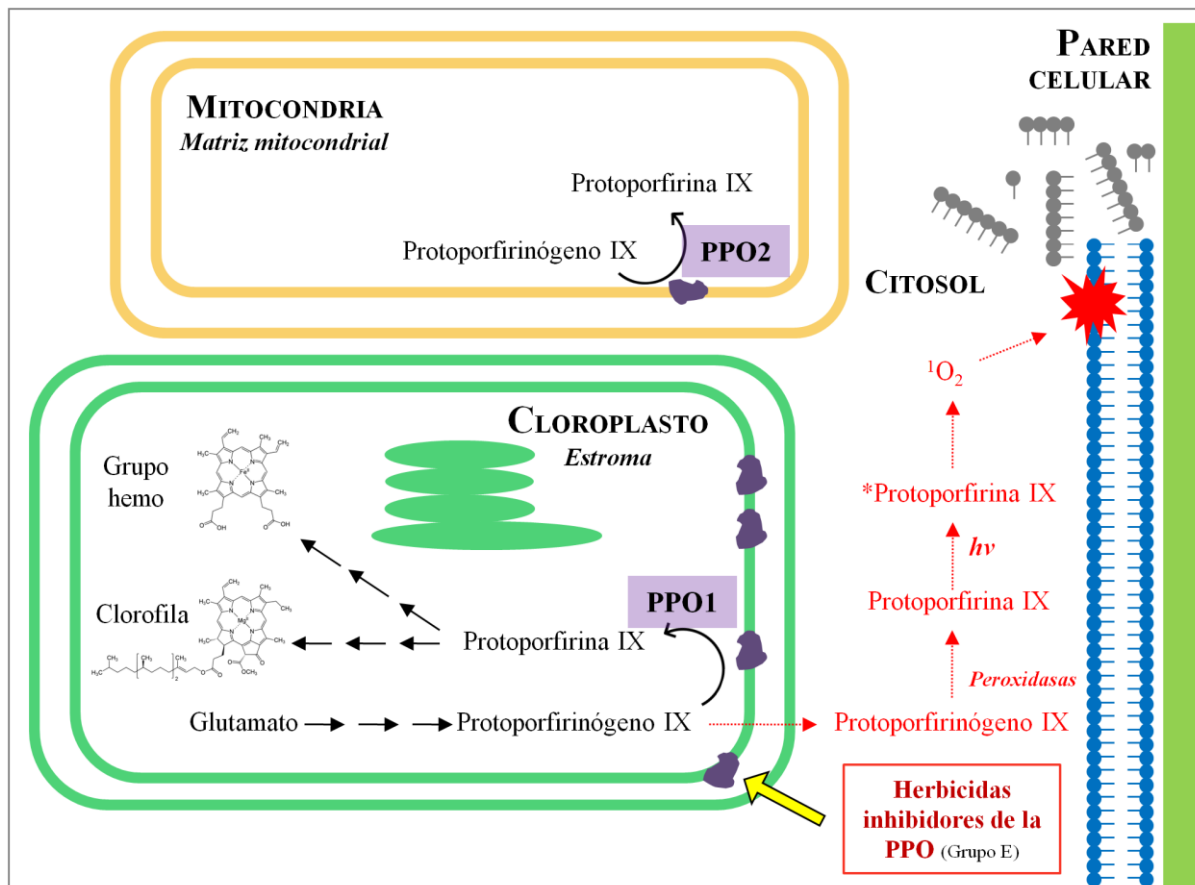


Figura V. Participación de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO) en la vía de síntesis del grupo hemo y clorofila. Los herbicidas del grupo E inhiben esta enzima y provocan una acumulación de protoporfirinógeno IX que sale al citosol y provoca una respuesta oxidativa. Imagen adaptada de Li et al. (2003).

Estos herbicidas fueron alguna vez ampliamente utilizados en el control postemergente de malezas latifoliadas en cultivos de soja, ya que esta especie es naturalmente tolerante a los inhibidores de la PPO por un mecanismo de rápida degradación metabólica (Dayan et al., 1997). Sin embargo, cuando se reportó por primera vez la resistencia a PPO en poblaciones de *A. tuberculatus* (Shoup et al., 2003), el uso de estos herbicidas ya había disminuido abruptamente debido a la adopción masiva de la soja tolerante a glifosato. A pesar de que la resistencia a inhibidores de la PPO ha evolucionado sólo en 13 especies hasta el momento (Heap, 2019), el número de casos de resistencia no deja de aumentar (Falk et al., 2005; Wuerfell et al., 2015; Heap, 2019). Este fenómeno probablemente se deba a que los inhibidores de la PPO son hoy una de las principales opciones para el control químico en

agroecosistemas donde las comunidades de malezas han desarrollado resistencia múltiple a glifosato e inhibidores de la ALS.

Los estudios con biotipos resistentes en las especies *Amaranthus tuberculatus* y *Amaranthus palmeri* revelaron una novedosa e inesperada mutación en la cual la resistencia es conferida por la delección de un aminoácido (Patzoldt et al., 2006; Salas et al., 2016). Se trata de una pérdida de un codón completo en el gen PPX2L que codifica una PPO de localización dual (cloroplástica y mitocondrial), que causa la eliminación de una glicina en la posición 210. Éste es el único reporte existente hasta el momento de una resistencia a herbicidas causada por la pérdida de un aminoácido.

La delección de la G210 confiere altos niveles de resistencia a los herbicidas inhibidores de la PPO con muy poco efecto sobre la afinidad por su sustrato. Según estudios de dinámica molecular, se concluyó que si bien dicha mutación no tiene impacto en la unión del sustrato, la enzima posee una eficiencia catalítica reducida debido a un sustancial reordenamiento estructural del sitio activo (Dayan et al., 2010). A su vez, estos estudios confirmaron que sustituciones simples en la Gly-210 brindarían poca o ninguna resistencia, o bien reducirían en gran medida la funcionalidad de la PPO.

Se considera que la eliminación de un aminoácido ($\sim 10^{-18}$) es un evento evolutivo muchísimo más raro que una sustitución ($\sim 10^{-9}$) (Gressel y Levy, 2006). Por lo tanto, el requisito para la pérdida simultánea de tres nucleótidos en la secuencia codificante del gen diana, sumado a la doble localización del producto del gen en cloroplastos y mitocondrias, debería limitar la evolución de este mecanismo de resistencia. Sin embargo, esta es la mutación que están apareciendo en numerosas poblaciones de *A. tuberculatus* resistentes en los Estados Unidos (Lee et al., 2008; Wuerfell et al., 2015). Este mecanismo de resistencia nuevo y poco probable vuelve a demostrar cómo el poder de la presión de selección puede evidenciar rasgos raros e inesperados capaces de otorgar resistencia. Hasta ahora, el uso continuado de los inhibidores de la PPO aplicados en preemergencia, junto con una aparente falta de reducción en la aptitud de los fenotipos resistentes, ha probablemente contribuido al mantenimiento del alelo de resistencia.

Dado que algunos herbicidas inhibidores de PPO suelo-residuales todavía proporcionan un control adecuado de los biotipos resistentes a herbicidas de otros grupos, siguen siendo una de las opciones más viables para el control de muchas especies resistentes de *Amaranthus* que provocan importantes pérdidas en cultivos de soja y algodón. Si bien no

se han detectado malezas resistentes a este grupo de herbicidas en Argentina, la historia ha demostrado que el uso intensivo de cualquier herbicida resulta en la selección de genes que confieren resistencia en las poblaciones de malezas.

1.4.6 Herbicidas inhibidores del fotosistema II

La fotosíntesis implica la captura y transducción biofísica de la energía solar para impulsar el transporte de electrones y subsecuentemente producir el NADPH y ATP requeridos para la síntesis de hidratos de carbono a partir de CO_2 . Básicamente, los herbicidas del grupo C compiten con la plastoquinona (PQ) en el sitio de unión a la proteína D1 dentro del complejo del fotosistema II (PSII) (Figura VI).

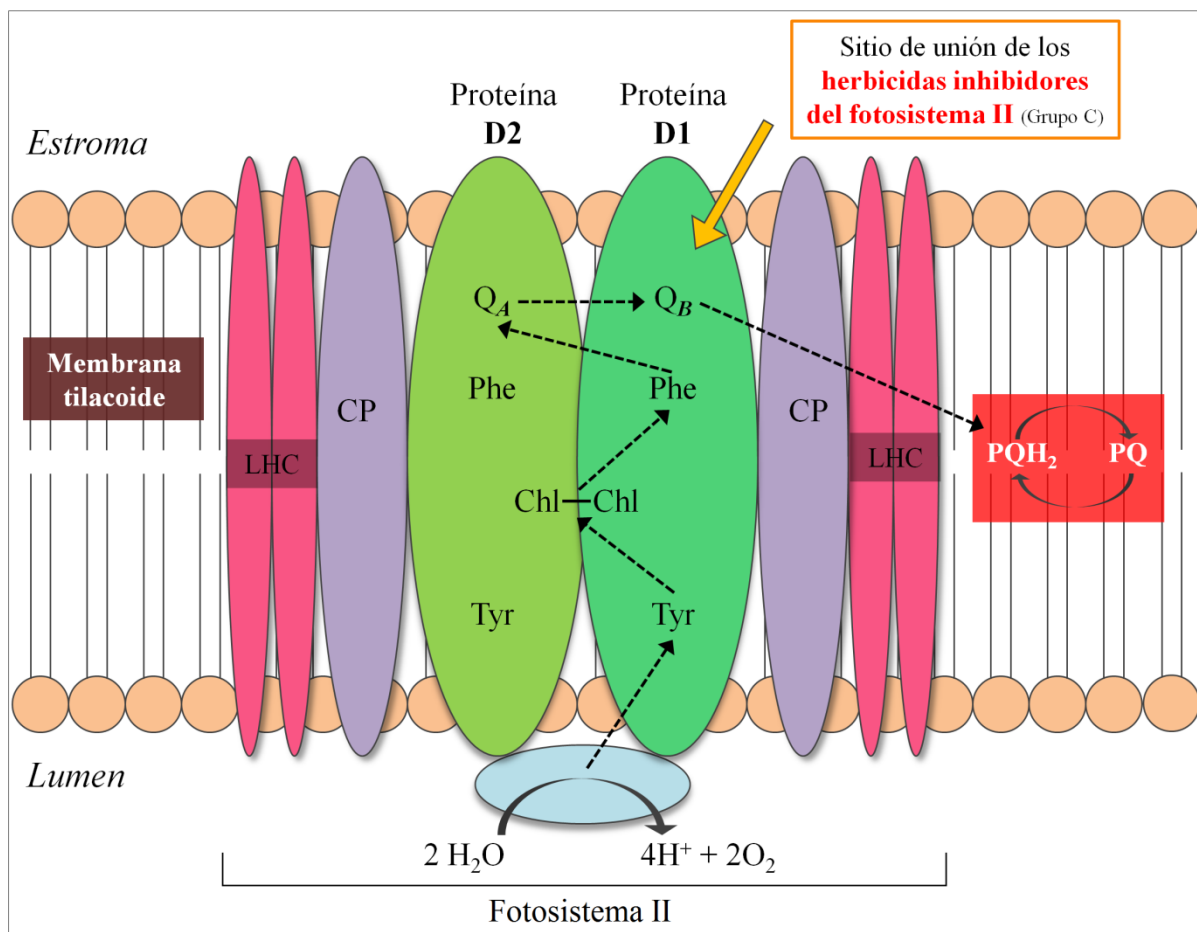


Figura VI. Esquema del Fotosistema II en la membrana tilacoide. La flecha amarilla indica el sitio en el cual los inhibidores del grupo C, como la atrazina, inhiben el proceso de transferencia de electrones. Imagen adaptada de Grattieri et al., 2017.

El bloqueo del flujo de electrones detiene la producción de NADPH y ATP y el ciclo de reducción del carbono. Esto genera una gran cantidad de moléculas de clorofila excitadas cuyos electrones reaccionan con oxígeno generando formas altamente tóxicas (peróxido de hidrógeno y superóxidos). Consecuentemente, se produce la degradación de la clorofila y los carotenoides y las especies reactivas de oxígeno peroxidizan a los lípidos de la membrana del cloroplasto, afectando la integridad de la misma. Así, se genera una desorganización celular y se produce la pérdida de componentes plasmáticos (Anderson, 1996; Arregui y Puricelli; 2008).

Los herbicidas de este grupo (C) son numerosos y están agrupados en varias familias químicas estructuralmente diversas, que les confieren distintas propiedades. Mientras que las triazinas, triazinonas, triazolinonas, fenilureas, ureas y uracilo son sistémicos; los nitrilos, benzonitrilos, benzotiadizoles y amidas funcionan como herbicidas de contacto (Cobb y Reade, 2010). A su vez, poseen una residualidad limitada que varía de acuerdo al producto. Los herbicidas sistémicos se aplican al suelo en preemergencia, se absorben por raíces y se translocan por xilema; en tanto que los herbicidas de contacto se aplican en postemergencia y se absorben por el follaje (Arregui y Puricelli; 2008).

Desde la década de 1950 en adelante, los herbicidas de la familia de las triazinas se adoptaron ampliamente a lo largo de todo el mundo en los cultivos de maíz y su uso persistente en poblaciones de malezas genéticamente diversas ha dado lugar a la evolución de la resistencia. Desde la primera publicación histórica, ya mencionada en la sección 1.4.2 (Ryan, 1970), la resistencia a triazinas ha evolucionado globalmente en 74 especies de malezas (Heap, 2019), representando el segundo grupo con mayor especies de malezas resistentes luego de los herbicidas del grupo B (inhibidores de la ALS).

Sorprendentemente, una única mutación de resistencia a inhibidores del PSII ha evolucionado de forma independiente a nivel mundial. Esta mutación puntual se da en el gen cloroplástico *psbA*, de herencia materna, y que codifica para la proteína D1. La sustitución provoca el cambio de una serina por una glicina en la posición 264 (S264G) en el sitio de unión a la PQ (Goloubinoff et al., 1984; Hirschberg y McIntosh, 1983). Con algunas excepciones, todas las especies de malezas resistentes a triazinas contienen esta mutación (Powles y Yu, 2010).

Como las triazinas y la PQ compiten directamente por el sitio de unión en la proteína D1, la sustitución S264G parece una de las pocas opciones que impide la unión de la triazina,

al tiempo que permite la unión de la PQ. La estructura molecular y el modelado del PSII muestran que en el sitio de unión a la PQ de la proteína D1, la S264 proporciona un enlace de hidrógeno que es importante para dicha unión. La sustitución con glicina elimina este enlace de hidrógeno clave para la unión de la PQ (Preston y Mallory-Smith, 2001), lo cual conlleva el costo de una fotosíntesis reducida (Gronwald, 1994).

A pesar de que la mutación S264G previene la unión a la triazina, existe una actividad normal para herbicidas de otras familias químicas ya que la naturaleza de la interacción con la proteína D1 es diferente (Preston y Mallory-Smith, 2001). En este sentido, se han reportado un total de cinco mutaciones diferentes a la anteriormente mencionada en un pequeño número de especies de malezas, tanto en la misma posición, como en diferentes posiciones.

Además de los mecanismos de RT previamente mencionados, la resistencia a herbicidas del PSII ha evolucionado en varias especies mediante mecanismos de RNT, sobre todo aquellos relacionados a un metabolismo aumentado mediado por citocromo-P450 y/o glutatión S-transferasas (Anderson y Gronwald, 1991; Tsujii et al., 2004; Powles y Yu, 2010).

En conclusión, está claro que la resistencia a las triazinas se debe casi exclusivamente a una mutación en el gen *psbA* que produce la sustitución S264G en el sitio de acción. El costo en la aptitud (o *fitness*) asociado a esta mutación ha reducido significativamente su impacto en la agricultura mundial, pero la evolución global independiente de esta mutación refleja un uso abrumador de la triazina en comparación con otros herbicidas PSII. Al día de la fecha, no se han detectado malezas resistentes a este grupo de herbicidas en Argentina.

1.5 ¿Cuán importante es el problema de las malezas resistentes a herbicidas en Argentina?

1.5.1 Contexto general

El primer caso de resistencia a herbicidas en Argentina se reportó en el 1996 para la especie *Amaranthus hybridus* L. (sin. *A. quitensis*), conocida como “yuyo colorado” (Tuesca y Nisensohn, 2001). Los biotipos, encontrados en el sur de las provincias de Santa Fe y Córdoba, presentaban resistencia cruzada a los inhibidores de la ALS imazetapir (IMI) y clorimurón-etil (SU), a cuya aplicación repetida habían sido expuestos. En 2005, se registró un biotipo de *Sorghum halepense* resistente a glifosato en campos cultivados con soja en la provincia de Salta (Heap, 2019). A partir de ese momento, innumerables casos de resistencia a

herbicidas de distintos grupos en diversas malezas son denunciados periódicamente por los agricultores. Al día de la fecha, son 15 las especies de malezas que han desarrollado resistencia a herbicidas pertenecientes al menos a un sitio de acción en Argentina. Todos los casos reportados oficialmente se resumen en la Tabla II, detallando los principales cultivos afectados.

Tabla II. Malezas resistentes a herbicidas en Argentina. *El año generalmente corresponde al momento en que se reportó empírica y oficialmente la resistencia, pudiendo no coincidir con el año de detección a campo. Algunos casos reportados extraoficialmente pueden estar ausentes. La mayoría de los valores fueron tomados de la base de datos de weedscience.org (Heap, 2019).

Especie (En orden cronológico)	Nombre común	Año*	Cultivo(S)	Sitio(s) de acción
<i>Amaranthus hybridus</i>	Yuyo colorado	1996 2013 2014 2016 2016	Soja Soja Soja y maíz Soja Soja	ALS EPSPS ALS + EPSPS Auxinas sintéticas (AS) EPSPS + AS
<i>Sorghum halepense</i>	Sorgo de alepo	2005 2015 2015	Soja Soja Soja	EPSPS ACCasa EPSPS + ACCasa
<i>Lolium perenne</i> spp. <i>multiflorum</i>	Raigrás criollo	2007 2009 2010	Cereales - Trigo	EPSPS ACCasa ALS + EPSPS
<i>Lolium perenne</i>	Raigrás perenne	2008	Soja, trigo y cebada	EPSPS
<i>Cynodon hirsutus</i>	Gramilla mansa	2008	Maíz y soja	EPSPS
<i>Raphanus sativus</i>	Nabón	2008	Canola, girasol y trigo	ALS
<i>Echinochloa colona</i>	Capím	2009	Maíz y trigo	EPSPS
<i>Avena fatua</i>	Avena guacha	2010	Cebada y trigo	ACCasa
<i>Eleusine indica</i>	Pata de ganso	2012	Maíz y soja	EPSPS
<i>Conyza bonariensis</i>	Rama negra	2012	Soja	EPSPS
<i>Brassica rapa</i>	Nabo	2012	Soja y Trigo	ALS + EPSPS
<i>Hirschfeldia incana</i>	Nabo amarillo	2013 2016	- -	ALS ALS + Auxinas sintéticas
<i>Digitaria insularis</i>	Pasto amargo	2014	Soja	EPSPS
<i>Amaranthus palmeri</i>	Yuyo colorado	2015 2016	Soja Soja	EPSPS ALS
<i>Bromus catharticus</i>	Cebadilla criolla	2017	Trigo y cebada	EPSPS

1.5.2 El género *Amaranthus*

El género *Amaranthus* pertenece a la familia *Amaranthaceae* e incluye alrededor de 70 especies, 40 de las cuales son nativas de América y el resto se distribuye en Australia, África, Asia y Europa (Costea et al., 2001). Algunas de las especies pertenecientes a este género se

cultivan como hortalizas, pseudocereales y vegetales, mientras que otras como plantas ornamentales. Además, otras especies son utilizadas como forrajeras y como plantas medicinales (Martínez-Crovetto, 1981). No obstante, muchas plantas pertenecientes a este grupo constituyen importantes malezas que afectan principalmente a cultivos de estación cálida (Webster, 2006).

El éxito de las especies del género *Amaranthus* radica en sus habilidades de crecimiento, desarrollo y reproducción. Son plantas C4 anuales que emergen después de las heladas de primavera, crecen rápidamente, compiten agresivamente con los cultivos de estación cálida, toleran la sequía, responden a los altos niveles de nutrientes disponibles y están adaptadas para evitar sombras a través de una rápida elongación del tallo (Schonbeck, 2014). Adicionalmente, presentan una gran variabilidad genética y una inusitadamente alta producción de semillas que pueden distribuirse y germinar eficientemente (Lovell et al., 1996), lo cual coloca a estas especies dentro de las malezas anuales latifoliadas con más probabilidad de desarrollar biotipos resistentes a herbicidas.

En particular, *Amaranthus hybridus* L. es una de las especies del género nativas de Sudamérica, y actualmente la más problemática para los cultivos de verano en Argentina (REM, 2019). Esta especie se encuentra distribuida en la región que abarca desde Río Negro hasta el norte del país, afectando particularmente a cultivos de soja, maíz y girasol en la región pampeana. Se trata de una especie monoica y sus plantas pueden alcanzar una altura superior a los 2 m.

Existen 31 reportes de resistencia en esta especie a 6 modos de acción diferentes a lo largo del mundo (Heap, 2019). A pesar de que la resistencia a inhibidores ALS en *A. hybridus* en Argentina fue documentada hace más de dos décadas y la distribución de poblaciones con este fenotipo es alarmante (Figura VII), son escasos los reportes oficiales de los mecanismos moleculares causantes de dicha resistencia.

Por su parte, *Amaranthus palmeri* S. Watson es una especie originaria de Estados Unidos y fue detectada por primera vez en Argentina en 2013 (Morichetti et al., 2013; Berger et al., 2016). A pesar de su breve período de permanencia en Argentina, hoy representa la segunda especie más problemática en los sistemas de producción (REM, 2019) y es una de las más problemáticas a nivel mundial, habiéndose reportado 60 casos de resistencia a 6 modos de acción diferentes (Heap, 2019). Por ello, resulta relevante confirmar las resistencias

reportadas a campo e intensificar los estudios sobre las bases moleculares de dichas resistencias.

La rápida dispersión que han alcanzado las poblaciones resistentes a glifosato en Argentina en tan pocos años (Figura VII), refleja ciertos atributos biológicos que convierten a esta especie en una maleza especialmente agresiva y difícil de manejar eficazmente con los recursos tecnológicos disponibles actualmente.

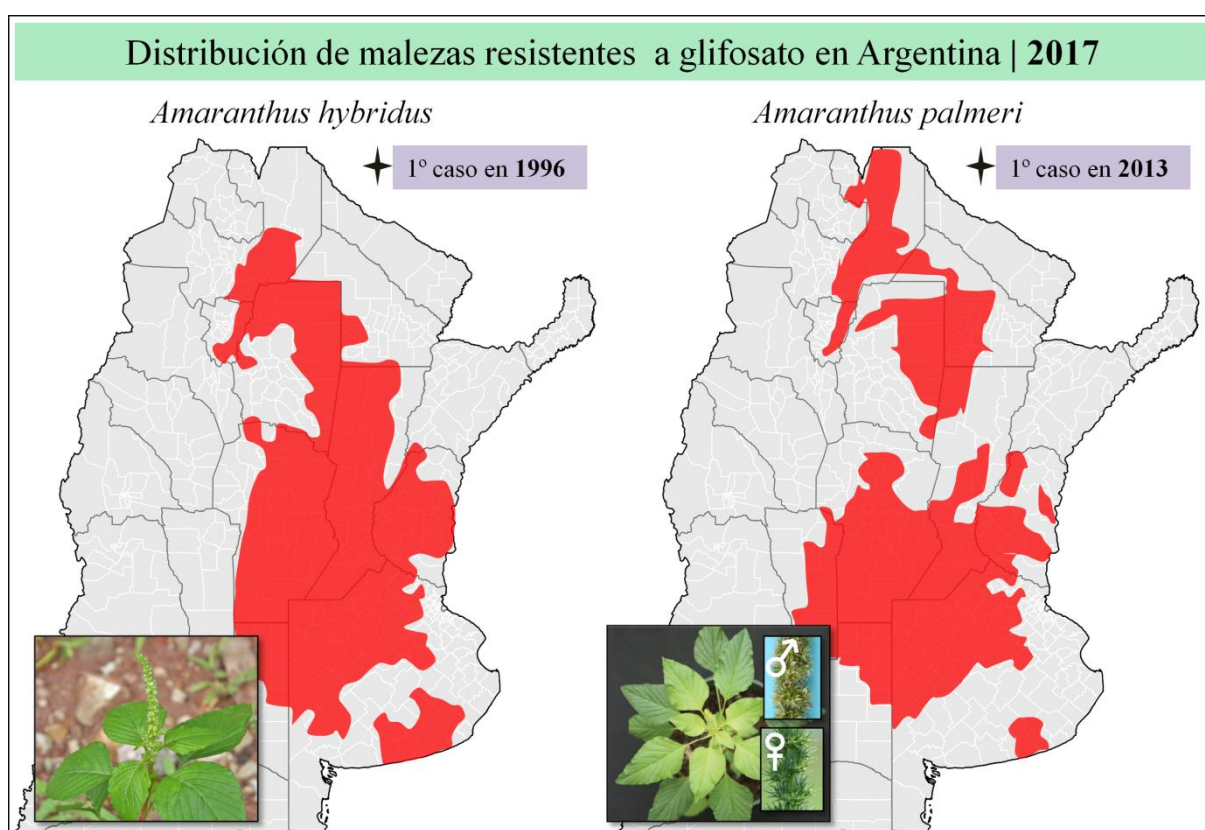


Figura VII. Distribución de biotipos resistentes a glifosato de *Amaranthus hybridus* (izquierda) y *Amaranthus palmeri* (derecha) en Argentina. Los datos para la construcción de la figura remiten a un censo acumulativo realizado en 2017 (REM, 2019).

A diferencia del resto de las especies de *Amaranthus* conocidas en Argentina, *A. palmeri* es una especie anual diclino dioica, siendo esencialmente alógama. Esto incrementa la variabilidad genética y la tasa de evolución de los mecanismos de resistencia, ya que además puede hibridar con otras especies del género (Trucco et al., 2005). Por otro lado, las plantas erectas pueden alcanzar una altura superior a los 2,5 m (Morichetti y Ferrell, 2010), con una tasa de crecimiento que puede superar los 4 cm por día. Su sistema radicular es

extenso, profundo y puede realizar un uso del agua muy eficiente (Black et al., 1969). Por último, las plantas de *A. palmeri* pueden producir hasta 600.000 semillas, las cuales son capaces de germinar durante toda la estación de crecimiento (Jha et al., 2007; Tuesca et al., 2013). Todas estas características hacen que esta especie acumule mayor biomasa, produzca más semillas y cause mayores pérdidas de rendimiento en soja que otros “yuyos colorados” (Bensch et al., 2003).

Finalmente, *Amaranthus tuberculatus* Moq. Sauer es una de las malezas más problemáticas en los estados de Illinois, Iowa y Missouri (Estados Unidos), provocando pérdidas de rendimiento de hasta el 43% en cultivos de soja y hasta el 74% en cultivos de maíz (Hager et al., 2002; Steckel y Sprague, 2004). Al ser una especie dioica, como *A. palmeri*, la polinización cruzada obligada favorece el enriquecimiento y recombinación de los alelos asociados a la resistencia. Así, desde el reporte inicial de una población resistente a herbicidas inhibidores del fotosistema II a comienzos de la década del 90 (Anderson et al., 1996), la evolución de la resistencia rápidamente se apoderó de otros sitios de acción (incluyendo inhibidores ALS, PPO, EPSPS, HPPD y auxinas sintéticas), con numerosos casos de resistencia múltiple en una misma población (Heap, 2019). Actualmente, 59 casos de resistencia a herbicidas en *A. tuberculatus* han sido reportados a lo largo de 18 estados de los Estados Unidos (Heap, 2019).

1.6 ¿Puede superarse la resistencia a herbicidas?

Existe una gran tendencia al empleo rutinario de aquellos herbicidas con mayor eficacia y más fáciles de usar, que justamente pertenecen a los grupos de principios activos para los que ha habido una mayor evolución de la resistencia. Frente a la problemática de biotipos de *A. palmeri* y *A. hybridus* resistentes a inhibidores de la ALS y la EPSPS, los herbicidas inhibidores de la PPO están siendo empleados con elevada intensidad y frecuencia, aumentando la probabilidad de seleccionar biotipos con resistencia a este mecanismo de acción. De continuar esta tendencia, es factible que en el mediano plazo surjan casos de resistencia múltiple a inhibidores de la PPO y la ALS, PPO y EPSPS o, aún peor, casos de resistencia a los tres modos de acción. Así, la diversificación de los principios activos es clave si se pretende conservar la utilidad práctica y económica de los herbicidas del grupo E (Tuesca et al., 2016).

Una de las lecciones aprendidas a raíz del uso excesivo del glifosato es que los sistemas de manejo de malezas basados únicamente en herbicidas no son sostenibles a largo plazo. Un programa de manejo de malezas que diversifique al máximo los métodos utilizados sería altamente deseable. Se podrían utilizar dos tipos de estrategias fundamentales para mitigar y controlar la resistencia a los herbicidas. Por un lado, las medidas proactivas, que apuntan a reducir la presión de selección de los herbicidas, minimizando así la supervivencia y la reproducción de individuos resistentes. Por el otro lado, las medidas reactivas, que apuntan a disminuir la propagación de la resistencia debida a la producción de semillas, el movimiento de polen y la diseminación de propágulos (Norsworthy et al., 2012).

Las estrategias actuales suelen consistir meramente en medidas reactivas, fenómeno que ha sido asociado a múltiples factores (Hurley y Frisvold, 2016; Norsworthy et al., 2012). Brevemente, las dos razones principales para la menor adopción de estrategias proactivas por parte de los productores son el aumento de los costos que esto implica, junto con la percepción de que los beneficios de retrasar la resistencia son inciertos, además de la expectativa de que nuevos herbicidas estarán disponibles en el futuro. Sin embargo, se requiere una mejor comprensión del componente humano relacionado al manejo de malezas para abordar este tema con la seriedad que su complejidad amerita.

Existe un conjunto de prácticas que podrían integrarse dentro de los programas de manejo de malezas para abordar una intensificación agrícola sostenible, componente indeludible de los sistemas de producción que buscarán satisfacer la creciente demanda de alimentos a nivel mundial en las próximas décadas (Struik y Kuyper, 2017).

Dentro de las prácticas relacionadas al control químico, se recomienda particularmente la rotación de herbicidas con distinto modo de acción, la utilización de mezclas de herbicidas y, aún más, la rotación de mezclas de herbicidas. Estas estrategias se sustentan en el hecho de que los alelos de resistencia disminuirán en frecuencia al eliminar la presión de selección que los favorece (Meagher et al., 2003). Además, la utilización de las dosis recomendadas en el marbete es fundamental, ya que la sobre- o sub-dosificación también son factores desencadenantes de la aparición de resistencia.

Adicionalmente, una de las estrategias más prometedoras consiste en el diseño de un sistema de rotación de cultivos basado en conocimiento agronómico sólido, ya que a través de un esquema de diversificación temporal se puede reducir notablemente la densidad de la población de malezas y su producción de biomasa (Owen, 2016). Otro beneficio clave de la

rotación es que favorece la diversidad de herbicidas utilizables debido a los diferentes modos de acción disponibles para cada cultivo. Así, se debe intensificar el diseño de modelos de rotación de herbicidas dentro de programas de rotación de cultivos.

Por otro lado, las estrategias que maximizan la competencia de los cultivares no sólo reducen las pérdidas de rendimiento, sino que también pueden disminuir la presión de selección y la dependencia del control químico para manejar las malezas. A pesar de ser amigables con el medio ambiente, las estrategias relacionadas a la competencia del cultivo están muy poco explotadas (Sardana et al., 2017). Por lo general, esto ha sido asociado a una escasa comprensión de las interacciones entre cultivos y malezas, lo cual dificulta el desarrollo de tácticas sostenibles y rentables (Swanton et al., 2015).

La alternancia de nuevas y viejas prácticas a veces puede resultar útil. Por ejemplo, es conocido que la abundancia de malezas perennes aumenta después de varios años de reducción de la labranza, dado que la perturbación de los propágulos vegetativos es menor y las semillas permanecen cerca de la superficie del suelo (Cardina et al., 2002). Así, el uso ocasional de prácticas de labranza en un sistema de siembra directa podría representar una forma de controlar estas malezas problemáticas, ya que es la mejor práctica para perturbar los propágulos vegetativos y restaurar el equilibrio en los bancos de semillas del suelo (Owen, 2016).

En lo que respecta a las sustancias alelopáticas, existe un interés creciente por el descubrimiento de nuevos compuestos naturales que puedan ser utilizados como bioherbicidas. Además de los beneficios medioambientales, los bioherbicidas representarían una menor probabilidad teórica de aparición de resistencia ya que poseen múltiples sitios de acción (Upadhyaya y Blackshaw, 2007; Radhakrishnan et al., 2018). Sin embargo, esta característica trae aparejada una baja especificidad, lo cual hace que los bioherbicidas no sean selectivos, sean altamente dependientes de la dosis y, en algunos casos, resulten fitotóxicos. En consecuencia, el uso de una alelopatina como potencial bioherbicida es posible, pero está restringido a un cultivo en particular con una composición de malezas bien definida (Soltys et al., 2013). Probablemente, esta no-selectividad intrínseca y su usual corta vida media sean las principales razones por las que los bioherbicidas no se están implementando en forma extendida (Cordeau et al., 2016).

Por otro lado, las estrategias que van de la mano con las nuevas tecnologías, como la agricultura de precisión o agricultura inteligente, pueden mejorar la eficiencia de gestión de

los insumos agrícolas y reducir el impacto ambiental de los sistemas de producción de cultivos mediante el uso de información sitio-específica (Bongiovanni y Lowenberg-DeBoer, 2004). La agro-nanotecnología también puede contribuir al manejo de malezas. Ya ha sido demostrado que la liberación controlada y paulatina de un herbicida mediante la nanoencapsulación del ingrediente activo, por ejemplo, minimizaría la necesidad de aplicaciones repetidas y reduciría los efectos adversos de los herbicidas en las plantas y en el ambiente (Nuruzzaman et al., 2016; Wang et al., 2016).

Finalmente, los cultivos genéticamente modificados pueden contribuir a mantener o a aumentar la diversidad de herbicidas utilizables. Además de ser posible la acumulación de múltiples eventos de resistencia, la evolución dirigida mediante nuevas técnicas de mutagénesis (por oligonucleótidos -ODMs- o por nucleasas genéticamente modificadas como TALE o CRISPR) está en auge. Estas nuevas tecnologías ya comenzaron a aplicarse a la resistencia a herbicidas en cultivos, particularmente en el desarrollo de una canola resistente a inhibidores de la ALS mediada por ODMs (Sauer et al., 2016) que está disponible en los Estados Unidos. Ciertas aplicaciones de la tecnología de interferencia de ARN (ARNi) podrían ayudar a restaurar la susceptibilidad de las malezas a los herbicidas justo antes de la aplicación de los mismos (Shaner y Beckie, 2014). La utilización de la tecnología CRISPR/Cas9 podría restaurar la susceptibilidad de una población completa reemplazando el alelo resistente por su versión susceptible. Esta metodología, conocida como “Gen drive” ha sido validada en modelos no vegetales y permite la rápida propagación de un gen debido a una herencia supermendeliana (Esvelt et al., 2014; Weeks et al., 2016). Así, esta técnica tendría el potencial de suprimir la proliferación y diseminación de los biotipos de malezas resistentes a herbicidas.

Aunque algunas de las herramientas mencionadas muestran un gran potencial para mitigar la RH, las preocupaciones sobre posibles perturbaciones ecológicas aún impiden su aplicación a nivel de campo. Por lo tanto, cobran especial relevancia aquellas estrategias convencionales normalmente sub-explotadas. Es primordial conocer la biología de las malezas, y realizar monitoreos continuos a campo para conocer su historia antes de las aplicaciones, de manera de poder realizar una correcta selección del producto, de su dosis y del momento óptimo de aplicación de acuerdo al estado fenológico del espectro completo de malezas presentes. De esta manera, se facilitará un diseño racional de las rotaciones de mezclas de herbicidas en sintonía con las rotaciones de cultivos, la eventual utilización de

cultivos de cobertura, de cultivares con mayor competitividad frente a las malezas y de herramientas de agricultura de precisión, en caso que resultara factible y rentable.

¿Cuán entendida o rápida será la adopción de este tipo de estrategias por los agricultores de todo el mundo? En la respuesta a esta pregunta se encuentra la perspectiva real del desafío más importante al que se enfrentará la agricultura en los próximos años.

1.7 ¿Qué herramientas puede aportar el conocimiento científico?

El desarrollo de estrategias efectivas de control de malezas requiere un amplio conocimiento a nivel de especie. Esto incluye el conocimiento de la biología de las flores y los sistemas reproductivos, la fecundidad, las variaciones en la latencia de las semillas, las distancias de migración de las semillas y el polen, el balance costo/beneficio del mantenimiento del polimorfismo genético, por mencionar algunas. Además, identificar y dilucidar las bases moleculares de los mecanismos de resistencia es también de crucial importancia; especialmente hoy en día que el manejo de malezas requiere de la integración de múltiples enfoques.

Un factor genético importante a considerar es la ploidía de cada especie de maleza. Muchas de las principales malezas son poliploides, siendo genéticamente más diversas que las diploides por contener más copias de cada gen. Así, sería esperable que esta redundancia de genes posibilite una mayor diversidad de mutaciones en los genes causantes de la RH y promueva una evolución de la resistencia más rápida. Sin embargo, en las especies poliploides, la magnitud de la resistencia conferida por una mutación en un gen puede diluirse por múltiples alelos hermanos, lo que desencadena una correlación negativa entre el número de copias del gen blanco y el nivel de resistencia (Panozzo et al., 2013). Sólo unos pocos estudios intentaron determinar el vínculo entre la ploidía y la tasa de evolución de las plantas con RH. Por ejemplo, Yu et al. (2013) informaron que una avena silvestre hexaploide (*A. fatua*) era resistente a los inhibidores de la ACCasa y se propuso una asociación negativa entre la ploidía y la evolución de la RH.

Por su parte, comprender los mecanismos de resistencia de una maleza a un herbicida es importante en múltiples aspectos. Por ejemplo, en el caso del glifosato, identificar los mecanismos de resistencia permitió a los científicos comprender mejor el modo de acción del

dicho herbicida, desarrollar métodos para su detección y tomar conciencia sobre la rápida propagación de la resistencia entre las distintas especies de malezas (Shaner et al., 2012).

Además, conocer si una población de malezas presenta mecanismos de RT y/o RNT es crucial para el desarrollo de estrategias de manejo de las poblaciones con RH. Es sabido que algunos mecanismos causan resistencia a algunos, pero no a todos, los herbicidas que inhiben el mismo sitio de acción. Por ejemplo, la sustitución Y263F en la proteína D1 del fotosistema II que causa resistencia a atrazina, un inhibidor del PSII, resulta súper sensible a la acción del diurón, otro inhibidor del PSII perteniente a otra familia química (Oettmeier, 1999). De manera análoga, la sustitución W574L en la proteína ALS, limitaría la rotación a herbicidas con diferente modo de acción debido que este mecanismo causa resistencia cruzada a todas las familias químicas de inhibidores de la ALS, mientras que la sustitución A122T en la misma enzima permitiría la rotación con herbicidas tanto dentro como fuera del modo de acción, dado que este mecanismo sólo confiere resistencia a la familia de las IMI (Yu y Powles, 2014).

Por el contrario, la presencia de mecanismos de RNT es más compleja de interpretar en términos de decisiones de manejo. Esto se debe principalmente a la alta complejidad de estos mecanismos y a su pobre caracterización molecular, como se ha mencionado en la sección 1.4.2.

Existen varios reportes de biotipos con resistencia múltiple que presentan diferentes mecanismos de RNT en simultáneo. Si bien cada mecanismo resultó ser herbicida-específico (Iwakami et al., 2014; Letouzé y Jacques, 2003; Preston et al., 1996), no se puede descartar la posibilidad de que un único mecanismo de RNT cause una resistencia múltiple. Por ejemplo, la sobreexpresión de una enzima antioxidante, podría prevenir el estrés oxidativo letal provocado por diferentes herbicidas (Markus et al., 2017). De manera similar, una alteración en algunos transportadores transmembrana podría afectar simultáneamente la translocación de varios ingredientes activos, o una alteración en la actividad del citocromo P-450 podría desencadenar el metabolismo de varios herbicidas. Por lo tanto, la detección de un mecanismo de RNT potencialmente único en una población de malezas podría alertar sobre la imposibilidad de uso de herbicidas con diferente MoA. La detección de mecanismos de RNT será definitivamente más útil en los programas de manejo de malezas cuando se logre una mejor comprensión de los mismos.

Más aún, los mecanismos de resistencia pueden influir en el modo de dispersión de la misma. Como ya se ha mencionado anteriormente, la herencia de los mecanismos de RT a atrazina es exclusivamente materna (Oettmeier, 1999), mientras que los mecanismos de RNT son comúnmente heredados en forma Mendeliana (Huffman et al., 2015). Así, la herencia nuclear posibilita una dispersión más segura de los alelos de resistencia a través del polen.

Finalmente, entender los mecanismos habilita a la creación de marcadores moleculares específicos para su detección. El descubrimiento del mecanismo de resistencia a glifosato por amplificación del gen *epsps*, por ejemplo, permitió el desarrollo de una PCR cuantitativa en tiempo real que permite dilucidar los niveles de amplificación del gen (Gaines, 2009), técnica que se ha convertido en rutinaria en los laboratorios que estudian la resistencia a herbicidas en malezas.

En la Figura VIII se muestra un esquema del accionar cronológico-metodológico convencional para la confirmación de la resistencia genética de una especie de maleza (m) a una herbicida (H). Por lo general, la investigación de los mecanismos de resistencia es usualmente relegada, cuando en realidad es un componente decisivo para el diseño de las estrategias de manejo.

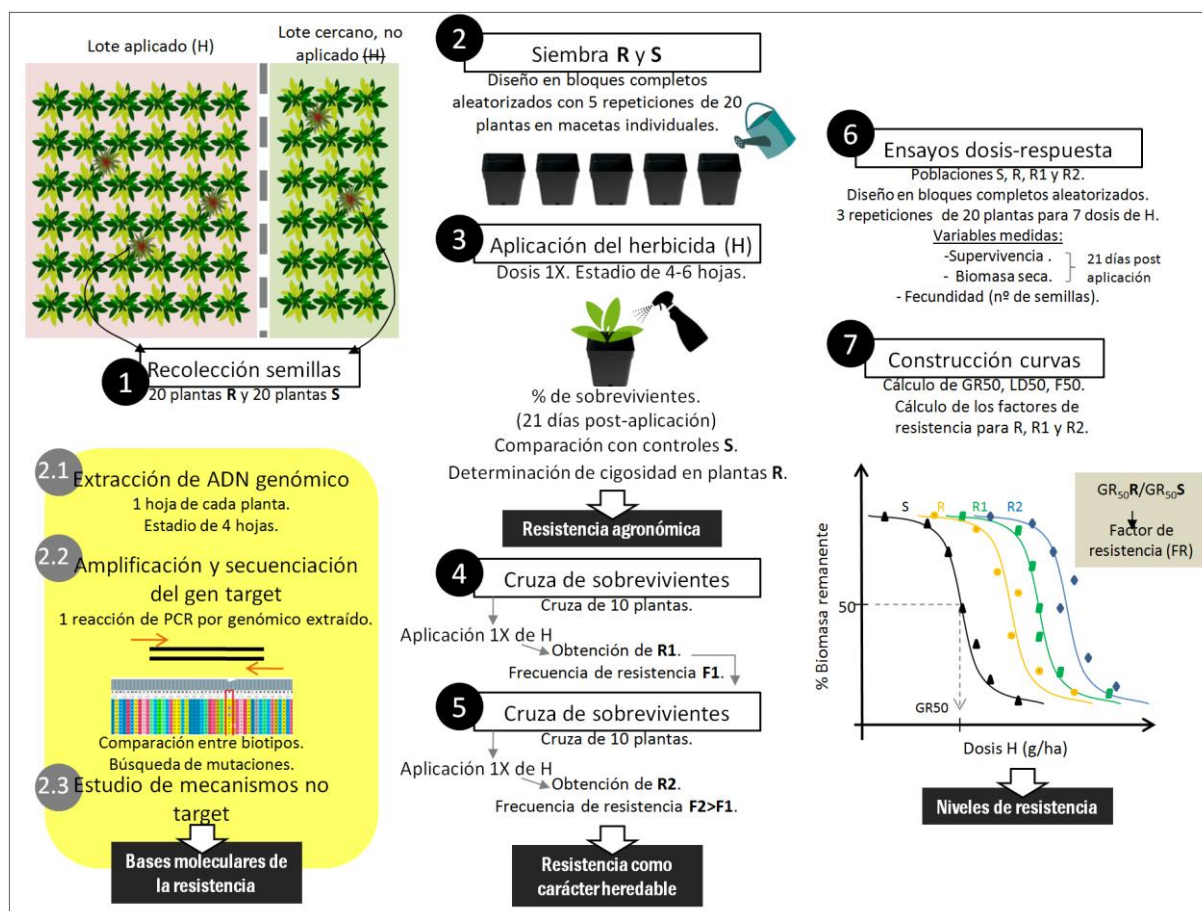


Figura VIII. Esquema cronológico-metodológico convencional para el estudio de la resistencia a herbicidas. Los pasos 1, 2 y 3 permiten la confirmación de la resistencia a nivel agronómico. Los pasos 4, 5, 6 y 7 permiten confirmar la resistencia como carácter heredable (resistencia genética) y los niveles de resistencia (a través del cálculo del parámetro FR). El estudio de los mecanismos moleculares causantes de la resistencia (2.1, 2.2 y 2.3) es un componente clave que frecuentemente se omite en la práctica.

Afortunadamente, en la actualidad son cada vez más los grupos de investigación avocados al estudio de los mecanismos moleculares que otorgan RH en malezas. A medida que se avance en la caracterización de los alelos implicados en la resistencia, la efectividad en la cuantificación de la misma a través del análisis molecular comenzará a aproximarse a la del fenotipado tradicional. En otras palabras, cuando se conoce de la presencia y distribución de la resistencia en una maleza problemática en un dado agroecosistema, los estudios moleculares (usualmente menos laboriosos, más rápidos y más precisos que los fenotipados tradicionales) permiten detectar el mecanismo al mismo tiempo que confirmar la resistencia. Este nuevo enfoque, posibilita un accionar más rápido y el movimiento de la balanza hacia el lado de las estrategias proactivas.

Objetivo general

Dilucidar los mecanismos moleculares responsables de la resistencia a herbicidas en poblaciones problemáticas del género *Amaranthus*, contribuyendo al diseño de estrategias de manejo basadas en conocimiento científico y, eventualmente, al desarrollo de herramientas de interés biotecnológico.

Hipótesis general

El estudio de los sitios de acción de los herbicidas a los cuales numerosas poblaciones del género *Amaranthus* han desarrollado resistencia recientemente, permitirá dilucidar los mecanismos moleculares causantes de la misma y desarrollar herramientas agronómicas y biotecnológicas de interés.



Modelado tridimensional de la versión 574L de la AcetoLactato Sintasa (ALS) de A. palmeri

CAPÍTULO 1

Los resultados descriptos a continuación fueron producto de un trabajo colaborativo con otros miembros del laboratorio de Biología Molecular de la FCA-UNR y con miembros del grupo de la Cátedra de Malezas de la FCA-UNR. Mis agradecimientos a todos ellos. En especial, a la Lic. Valeria Palmieri, a la Dra. y Profesora Valeria Perotti, al Profesor Daniel Tuesca y al Profesor Hugo Permingeat, coautores de los trabajos publicados producto de estos avances.

Publicaciones de referencia

Larran AS, Palmieri VE, Perotti VE, Lieber L, Tuesca D, Permingeat HR (2017) Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Amaranthus palmeri* from Argentina. *Pest Management Science* 73, 2578-2584.

Larran AS, Perotti VE, Palmieri VE, Permingeat HR (2017) Rápido método de selección de plantas resistentes a herbicidas. *Agromensajes* 48, 18-20.

CAPÍTULO 1

ESTUDIO DE LAS BASES BIOQUÍMICAS DE LA RESISTENCIA A INHIBIDORES DE LA ALS Y GLIFOSATO EN POBLACIONES DE *Amaranthus palmeri* RECIENTEMENTE DETECTADAS EN ARGENTINA

2.1 INTRODUCCIÓN

La resistencia a herbicidas en malezas es un problema que desafía a los sistemas agropecuarios de todo el mundo. La utilización intensa y repetitiva de unos pocos herbicidas, sumada a la pobre diversificación de las prácticas de manejo, constituyen la principal razón de la creciente evolución de la RH en malezas en las últimas décadas (Shaner y Beckie, 2014). Al día de la fecha, son 255 los reportes de especies diferentes que desarrollaron resistencia al menos a un herbicida (Heap, 2019). El glifosato ha sido el herbicida más exitoso y más utilizado durante los últimos 20 años, lo cual produjo un rápido aumento de los casos de RG y redujo significativamente el espectro de estrategias para el control químico debido a un bajo interés en el descubrimiento de nuevos herbicidas (Heap y Duke, 2018).

A pesar de que el glifosato fue introducido en el mercado en 1974, no existen reportes de resistencia hasta comienzos de los 2000, unos años luego de que comenzaran a comercializarse los cultivos tolerantes a este principio activo. Actualmente, 42 especies han evolucionado RG, 11 de ellas presentes en Argentina, y varios mecanismos fueron descriptos como responsables de dicho fenotipo (Heap, 2019; Heap y Duke, 2018). La sustitución P106S en la enzima EPSPS, introducida en la soja transgénica resistente, fue tempranamente descubierta en *Eleusine indica* (Baerson et al., 2002) y luego reportada en muchas otras especies, incluyendo nuevas sustituciones en esa misma posición (Yu et al., 2007; Kaundun et al., 2011; De Carvalho et al., 2012; Gonzalez-Torralva et al., 2012a; Nandula et al., 2013; Ngo et al., 2018). Más aún, la novedosa sustitución T102S ha sido recientemente asociada a la RG (Li et al., 2018). Estas mutaciones simples en el gen *epsps* usualmente confieren bajos niveles de resistencia a la vez que preservan la eficiencia catalítica de la enzima EPSPS.

Otro mecanismo asociado al sitio de acción, que involucra la sobreexpresión del gen *epsps* producida por una amplificación génica, fue descubierto hace casi una década en *A. palmeri* (Gaines et al., 2010). Este mecanismo confiere altos niveles de RG y parece ser el

mecanismo predominante en varias especies (Tranel et al., 2011; Salas et al., 2012; Wiersma et al., 2015; Nandula et al., 2014; Malone et al., 2016).

Por otro lado, el interés creciente en la caracterización molecular de los mecanismos no asociados al sitio de acción permitió la identificación de mecanismos que incluyen el secuestro activo del glifosato en vacuola y la translocación reducida del mismo (Peng et al., 2010; Yuan et al., 2010; Nol et al., 2012). Además, un mecanismo novedoso relacionado a una rápida necrosis del tejido expuesto a glifosato, conocido como fenómeno “fénix”, ha sido recientemente descripto (Van Horn et al., 2018; Moretti et al., 2018).

Curiosamente, una doble sustitución artificial en la EPSPS llamada “TIPS” conocida por otorgar altos niveles de RG en líneas de maíz comerciales transgénicas (Lebrun et al., 2003), ha sido encontrada en dos especies de malezas (*Eleusine indica* y *Bidens pilosa*) (Yu et al., 2015; Alcántara-de la Cruz et al., 2016a), evidenciando el poder de la evolución bajo una presión de selección persistente. La acumulación de múltiples mecanismos, principalmente en especies de polinización cruzada, produce altos niveles de resistencia y también es una consecuencia de la presión de selección ejercida por el continuo uso de glifosato (Nandula, 2010; Gherekloo et al., 2017).

Por su parte, los herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) también son muy utilizados, sobre todo debido a su control de amplio espectro, sus bajos costos y su baja toxicidad en mamíferos. No obstante, hasta ahora, el número de especies que han desarrollado resistencia a al menos uno de estos principios activos asciende a 160, representando el grupo con más especies de malezas resistentes dentro de todos los sitios de acción diferentes (Heap 2019).

Los primeros mecanismos de resistencia a inhibidores de la ALS fueron reportados en *Kochia scoparia* y *Lactuca serriola*, correspondiendo a las sustituciones P197T y P197H en la ALS, nombradas de acuerdo a la secuencia de referencia de *A. thaliana*, respectivamente (Guttieri et al., 1992). En las últimas dos décadas, 26 sustituciones de aminoácidos en ocho posiciones diferentes de la ALS han sido asociadas a la resistencia en 50 especies. Este número supera ampliamente a las mutaciones causantes de resistencia a herbicidas con otros genes blanco, lo cual indica que el gen *als* es un sitio blanco más propenso a la resistencia que el de otros herbicidas, como se detalló en la sección 1.4.4 de la introducción general (Yu y Powles, 2014).

En lo que respecta a mecanismos de RNT de los herbicidas inhibidores de la ALS, una tasa de metabolismo aumentado (comúnmente denominada *resistencia metabólica*) ha sido documentada en repetidas ocasiones y es considerada el mecanismo de RNT predominante (Yu y Powles, 2014).

Amaranthus palmeri S. Watson es una especie de maleza latifoliada (dicotiledónea) nativa de Norteamérica. *A. palmeri* tiene características germinativas, de crecimiento, de desarrollo y de reproducción que la hacen un especie altamente invasiva y adaptable, lo cual la convierte en un perfecto vector para la resistencia a herbicidas (Ward et al., 2013). Desde su primera detección en Argentina cinco años atrás (Morichetti et al., 2013), las poblaciones con resistencia a glifosato y a inhibidores de la ALS se han expandido en casi la totalidad de las áreas de cultivo de soja en Argentina (REM, 2019). Sin embargo, no se ha hecho hasta el momento una descripción de los mecanismos moleculares implicados en la resistencia de dichas poblaciones. Hasta ahora, la amplificación del gen *epsps* parece ser el principal mecanismo de RG en *A. palmeri* (Ward et al., 2013; Sammons y Gaines, 2014) y varias sustituciones en el gen *als* han sido documentadas para la especie: P197S, W574L, S653N (Nakka et al., 2017; Molin et al., 2016). Comprender las bases moleculares de la resistencia a herbicidas es un paso clave en el entendimiento del proceso evolutivo que causa este fenómeno y en el diseño de estrategias que permitan un control exitoso mediante el abordaje de programas integrados de manejo de malezas. En este capítulo, se investigan los mecanismos moleculares que causan resistencia a glifosato y a inhibidores de la ALS en poblaciones de *A. palmeri* colectadas durante los últimos años en Argentina.

Objetivo

Estudiar las bases bioquímicas y moleculares de la resistencia a glifosato y a inhibidores de la ALS en poblaciones *Amaranthus palmeri* recientemente encontradas en Argentina.

Hipótesis de trabajo

Las poblaciones de *Amaranthus palmeri* detectadas en Argentina presentan mecanismos de resistencia asociados al sitio de acción que las vuelven altamente insensibles al control con los herbicidas inhibidores de la ALS y/o glifosato.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Recolección del material vegetal

Para el estudio de la resistencia a herbicidas, se recolectaron semillas de *A. palmeri* de tres campos cultivados casi exclusivamente con soja. En cada caso, semillas de al menos 50 plantas se combinaron dentro de una sola muestra. En uno de estos campos (población 1), *A. palmeri* había sobrevivido a las aplicaciones del herbicida Derby® (i.a.: imazetapir 10% P/V), inhibidor de la ALS y del herbicida Roundup full II® (i.a.: glifosato 66.2% P/V, durante al menos cinco campañas seguidas. La población del segundo campo (población 2) nunca había sido enfrentada a inhibidores de la ALS pero sí a glifosato, por lo cual se sospechaba que presentaba resistencia sólo a este último herbicida. Una tercera población (población 3), localizada en un campo libre de la aplicación de glifosato, fue utilizada como control susceptible para los ensayos de aplicación de este herbicida. Las geolocalizaciones y nomenclaturas de cada población se resumen en la Tabla 1. Las coordenadas geográficas de las poblaciones 1 y 3 son muy similares debido a que fueron colectadas en campos de la misma localidad.

Tabla 1. Poblaciones de *Amaranthus palmeri* estudiadas

Pob.	Localidad	Nombre	Coordenadas	R glifosato?	R ALS?
1	Vicuña Mackenna	R	33°55'20.68" S 64°35'33.37" O	Sí	Sí
2	Tucumán	r	27°17'45.36" S 65°0'3.37" O	Sí	No
3	Vicuña Mackenna	S	33°55'17.0" S 64°35'17.9" O	No	¿?

2.2.2 Ensayos dosis-respuesta *in vivo*

Para evaluar la eficiencia de cada herbicida, se cultivaron aproximadamente 120 plántulas de cada población en cámaras de cultivo a 25 °C con un fotoperíodo de 16 h y una intensidad lumínica de 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. El sustrato consistió en una mezcla de tierra, arena y perlita (7:2:1) contenido en macetas plásticas de nueve cm de diámetro. Los experimentos se condujeron en un diseño en bloques completos al azar con cinco réplicas por dosis, donde cada réplica consistía en una maceta con tres plantas. Alcanzado el estadio de 4-6 hojas reales, diferentes dosis de tres herbicidas inhibidores de la ALS y de glifosato fueron aplicadas sobre cada población, de manera de obtener una curva que ajuste al modelo utilizado. Las dosis

utilizadas para los inhibidores de la ALS sobre las poblaciones R y r fueron: 0; 0,0625X; 0,125X; 0,250X; 0,5X; 1X; 2X; 4X; 8X; 16X y 32X; donde X=100 g i.a./ha para Derby (imazetapir 10% p/v), 50 g i.a./ha para Clorimurón (clorimurón-etil 25 % p/p) y 30 g i.a./ha para Spider (diclosulam 84 % p/p). En el caso del glifosato (RoundUp WeatherMax, sal potásica de glifosato 48,8 % p/p), las dosis aplicadas sobre las poblaciones R y S fueron: 0, 0,0625X, 0,125X, 0,250X, 0,5X, 1X, 2X, 4X, 8X, 16X y 32X; donde X=540 g i.a./ha y corresponde a la dosis recomendada de glifosato. Los herbicidas se aplicaron utilizando una mochila de presión constante con boquillas de ventilador planas a 206,84 kPa, calibradas para entregar 116 L/ha. El número de sobrevivientes se registró tres semanas después del tratamiento. El peso seco se registró cosechando todo el tejido aéreo de las plantas, colocándolo en una bolsa de papel y secándolo a 60 °C durante 48 hs.

Las curvas dosis-respuesta fueron obtenidas por ajuste a un modelo de regresión no lineal utilizando el software SigmaPlot (versión 11.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$y = \min + \frac{(\max - \min)}{1 + \left(\frac{x}{b}\right)^a}$$

donde y es el porcentaje de peso seco o de supervivencia, x es la concentración de herbicida, \min y \max son los límites inferiores y superiores de la curva, respectivamente, a es la pendiente de la curva en el punto de inflexión y b es la concentración de herbicida requerida para producir una reducción del crecimiento del 50% (GR₅₀) o una reducción del 50% de la supervivencia (Dosis Letal media, DL₅₀).

Los datos se expresaron como porcentaje de supervivencia de las plantas y reducción de la biomasa respecto a los controles no aplicados. Los parámetros obtenidos fueron sometidos a un análisis de la variancia (ANOVA) unifactorial en el software Sigma-Plot y las diferencias estadísticamente significativas se estimaron mediante el test de Holm-Sidak con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$).

2.2.3 Estudio del mecanismo de resistencia a inhibidores de la ALS

2.2.3.1 Ensayos de actividad enzimática *in vitro*

Semillas de las poblaciones R y r fueron desinfectadas, sembradas en medios artificiales (Murashige-Skoog (MS)-1% agar) con y sin la adición de imazetapir 2 μM e incubadas bajo un fotoperíodo de 16 h a una intensidad lumínica de 170-200 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ durante 15 días. Luego, diez plántulas de cada población fueron trasplantadas a macetas y, transcurridos 15 días, sus hojas fueron utilizadas para obtener extractos crudos de la enzima ALS. Dichos extractos se obtuvieron a través de la trituration del tejido en morteros conteniendo nitrógeno líquido, su resuspensión en buffer fosfato pH 7,5 y el posterior enriquecimiento en la proteína de interés mediante precipitación con sulfato de amonio, de acuerdo a lo descripto por Poston et al., (2002).

La actividad de la enzima ALS fue determinada espectrofotométricamente midiendo la cantidad de acetoína formada en presencia de distintas concentraciones de herbicidas, según una versión levemente modificada del método de Westerfeld (Yu et al., 2010). El método consistió en la conversión del acetolactato (producto de la reacción catalizada por la ALS) en acetoína, otorgando el medio ácido necesario para que esto ocurra. Las reacciones se llevaron a cabo durante 1 h a 37 °C. Las concentraciones de herbicida utilizadas fueron: 0; 0,25; 1; 5; 250 y 1000 μM para imazetapir; 0; 0,025; 0,1; 0,25; 1; 5; 25 y 250 μM para clorimurón-etil y diclosulam. La reacción fue detenida mediante el agregado de 5 μL de ácido sulfúrico 1N a los 200 μL de volumen final de reacción. Transcurridos 15 min de una incubación a 60 °C con α -naftol, los tubos fueron centrifugados y una alícuota de su sobrenadante fue utilizada para medir la absorbancia del complejo coloreado a 490 nm mediante un lector de microplacas BioTek (ELX800). Se incluyeron controles de acetolactato inicial, impidiendo la reacción mediante el agregado de ácido sulfúrico 1N a tiempo cero. La inhibición enzimática fue expresada a través del parámetro I_{50} , que representa la concentración de herbicida requerida para producir una inhibición de la actividad enzimática del 50% comparada con el control sin tratar. Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento y el experimento se repitió tres veces.

Los datos de actividad ALS fueron ajustados a una curva logística de tres parámetros, utilizando el mismo software, bajo la siguiente ecuación:

$$y = \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{I_{50}}\right)^b}$$

donde y es la actividad ALS, x es la concentración de herbicida, a es el límite superior de la curva, b es la pendiente de la curva e I_{50} corresponde a la concentración de herbicida requerida para causar un 50% de reducción en la actividad de la enzima.

Los parámetros obtenidos fueron sometidos a un análisis de la variancia (ANOVA) unifactorial en el software Sigma-Plot y las diferencias estadísticamente significativas se estimaron mediante el test de Holm-Sidak con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$).

2.2.3.2 Clonado y secuenciación del gen *als*

Se extrajo ADN genómico de tejido foliar fresco de diez plantas de cada población utilizando un kit de extracción de ADN genómico marca Wizard (Promega Corp., Madison, WI). Se generaron dos muestras compuestas que fueron utilizadas como molde para la amplificación del gen *als*, con oligonucleótidos específicamente diseñados sobre secuencias disponibles de especies cercanas (McNaughton *et al.*, 2005; Patzoldt y Tranel, 2007). El gen *als* completo fue amplificado con los oligonucleótidos X1 y X2 (Figura 1, Tabla 2) utilizando una polimerasa de alta fidelidad (Q5® High-Fidelity DNA polymerase, New England Biolabs, inc.). Las reacciones consistieron en ~100 ng de ADN, 500 nM de oligonucleótidos, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 1X de buffer, 1 unidad de Q5, y H₂O ultrapura hasta un volumen final de 50 µL. Las condiciones de ciclado fueron: 98 °C durante 1 min, 35 ciclos de 98 °C durante 10 seg, 57 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min, y un intervalo de extensión final a 72 °C durante 7 min. Los productos de amplificación fueron ligados al vector pGEM®-T easy (Promega) según las indicaciones del manual. Se prepararon células competentes de *E. Coli* DH5α por el método químico y se transformaron de acuerdo a protocolos estándar (Sambrook y Russell, 2001). Las transformantes fueron seleccionadas en placas con medio Luria-Bertani (LB) suplementadas con 100 µg/mL de ampicilina. La integración del inserto fue chequeada por PCR de colonia con los oligonucleótidos X3 y X4 listados en la Tabla 2. Se repicaron ocho colonias positivas de cada población y se inocularon en medio LB líquido, permitiendo el crecimiento durante toda la noche a 37 °C. Se realizaron minipreparaciones

plasmídicas, de acuerdo al protocolo de purificación de ADN plasmídico de Promega (Wizard® Plus SV Minipreps, DNA Purification System protocol, Promega Corp., Madison, WI). Los plásmidos recombinantes así obtenidos fueron sometidos a digestión y posterior electroforesis del ADN para confirmar la presencia del gen *als*. Posteriormente, se enviaron a secuenciar (Macrogen Inc., Korea) utilizando los oligonucleótidos X5, X6 y X7 diseñados para cubrir la totalidad del marco abierto de lectura (Tabla 2). Esta estrategia de clonado permite la identificación de secuencias para alelos individuales, libre de ambigüedad, a diferencia de lo que ocurre con la secuenciación directa de productos obtenidos por PCR.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR para el clonado y secuenciación del gen *als*

Nombre	Secuencia (5'-3')
X1	CTTCAAGCTTCAACAATGG
X2	CCTACAAAAAGCTTCTCCTCT
X3	CCAGAAAAGGTTGCGATGTT
X4	ATGCTTGGTAATGGATCGAG
X5	GGCAACCTAGAAAGATACCC
X6	CCTGAATGGCGTATTGCGGAGG
X7	GGAGGGAGGAGTTGAATGAGCAG



Figura 1. Localización de los oligonucleótidos utilizados dentro del marco abierto de lectura del gen *als*.

2.2.3.3 Análisis de las secuencias

Para generar las secuencias consenso de los alelos *als* de cada población, las lecturas individuales fueron alineadas con secuencias de referencia del género *Amaranthus* obtenidas del NCBI (National Centre for Biotechnology Information). El alineamiento se realizó utilizando el algoritmo MUSCLE del software Unipro Ugene v1.11.2 (Okonechnikov *et al.*, 2012). Una vez alineadas, las secuencias fueron traducidas y analizadas en busca de sustituciones aminoacídicas.

2.2.4 Estudio del mecanismo de resistencia a glifosato

2.2.4.1 Búsqueda de sustituciones en la prolina 106

Se extrajo ADN genómico a partir de tejido foliar fresco de seis plantas sobrevivientes a la dosis 1X de glifosato de las poblaciones R y r, y de seis plantas no aplicadas de la población S. Se utilizó el kit comercial de extracción de ADN genómico Wizard (Promega Corp., Madison, WI). Una alícuota de cada muestra de ADN fue utilizada en un ensayo de digestión diferencial de secuencias polimórficas amplificadas (dCAPS, por sus siglas en inglés: derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) con el objetivo de detectar sustituciones en la prolina 106 del gen *epsps* en cada planta. Este ensayo permite detectar el cambio de un nucleótido en una posición particular, mediante la amplificación con oligonucleótidos que introducen un sitio de corte para una enzima de restricción basados en la secuencia salvaje (o wild-type, wt). Si existe un polimorfismo nucleotídico, el sitio de restricción no se genera y el patrón de digestión es diferente.

La PCR y la digestión fueron llevadas a cabo como se describe en Chatham et al. (2015). El oligonucleótido directo fue EPSdcapsF1 (5'-ATGTTGGACGCTCTCAGAACTCTTGGT-3'), mientras que el reverso fue modificado para generar especificidad por poblaciones locales del género *Amaranthus* (EPSdcapsR1: 5'-TCCAGCAACGGCAACCGCAGCTGTCCATG-3'). Las digestiones fueron realizadas a 37 °C durante toda la noche, utilizando la enzima de restricción NcoI (Promega), que reconoce y corta específicamente la secuencia C[^]CATGG presente en la secuencia de tipo salvaje. Las bandas de ADN fueron visualizadas en geles de agarosa al 2% teñidos con SYBR safe (Invitrogen[®]). Muestras de ADN previamente secuenciadas fueron incluidas como controles para validar la fidelidad del test. La secuencia salvaje produce una única banda digerida de 156 pb, mientras que una mutación puntual en el tercer nucleótido codificante de la P106 produce la pérdida del sitio de restricción y la visualización de una única banda no digerida de 181 pb. Así, aquellas plantas que mostraron sólo la banda no digerida de 181 pb o ambas bandas fueron clasificadas como homocigotas y heterocigotas para sustituciones en la P106, respectivamente.

2.2.4.2 Secuenciación parcial del gen *epsps*

Las muestras de ADN genómico obtenidas en la sección anterior fueron utilizadas como molde para la amplificación de un segmento conservado de 195 pb correspondientes al 3er exón del gen *epsps*, el cual contiene al codón codificante de la P106. Los oligonucleótidos utilizados fueron EPSfwGa (5'-ATGTTGGACGCTCTCAGAACTCTTGGT-3') y EPSrvGa (5'-TGAATTTCTCCAGCAACGGCAA-3') y el protocolo de amplificación fue descrito previamente por Gaines et al. (2010). Una secuencia de ADN copia (ADNc) de *A. palmeri* obtenida del Gen Bank (FJ861243.1) fue utilizada como referencia para los alineamientos, que fueron conducidos tal cual se describe en la sección 2.2.3.3.

2.2.4.3 Número relativo de copias del gen *epsps*

La amplificación en el número de copias del gen *epsps* fue estudiada mediante PCR cuantitativa en tiempo real (real-time qPCR). Se utilizaron los oligonucleótidos Egf (5'-ATGTTGGACGCTCTCAGAACTCTTGGT-3') y Egr (5'-TGAATTTCTCCAGCAACGGCAA-3') previamente diseñados por Gaines *et al.* (2010) para amplificar un fragmento génico de 195 pb. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 13 µL, conteniendo oligonucleótidos en una concentración de 200 nM, 1X de Mezcla real (Realmix, Biodynamics) y 50 ng de cada ADN genómico obtenido en 2.2.4.1. Cada muestra biológica fue procesada por triplicado. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen) programado de la siguiente manera: 2 min a 95 °C; 40 ciclos de: 15 seg a 95 °C, 30 seg a 58 °C y 30 seg a 72 °C. Al final del ciclado, la especificidad en la amplificación de los productos fue chequeada mediante la construcción de curvas de fusión (86 ciclos de 10 seg variando la temperatura entre 72 y 95 °C, con un incremento de 0,5 °C a partir del 2º ciclo). La eficiencia de la amplificación fue calculada independientemente en cada reacción y fue considerada para el procesamiento de los datos. Las cuantificaciones comparativas de los valores Ct (definido como el ciclo umbral al partir del cual la señal de fluorescencia se incrementa por encima del ruido durante la fase exponencial de la reacción de PCR) fueron hechas con el software REST (Relative Expression Software Tool V 2.0.7 for Rotor Gene, Corbett Life Sciences) (Pfaffl et al., 2002), utilizando al gen *als* como control de bajo número de copias con herencia monogénica en otras especies de *Amaranthus* (Trucco *et al.*, 2005). Los resultados se

expresaron como el número de veces en el que las copias del gen *epsps* están incrementadas en las plantas resistentes respecto de las susceptibles. Las diferencias estadísticamente significativas fueron estimadas a través del test de aleatorización provisto por el software REST.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Resistencia a inhibidores de la ALS

2.3.1.1 Ensayos dosis-respuesta *in vivo*

Con el objetivo de confirmar y cuantificar la sospechada resistencia de la población R a inhibidores de la ALS, se llevaron a cabo ensayos dosis-respuesta *in vivo*. Los porcentajes de supervivencia y biomasa remanente fueron sustancialmente más elevados en la población R que en la población r (control susceptible). En la Figura 2 puede observarse que ambas variables se mantuvieron, en general, por encima del 60% para la población R, inclusive a las dosis más elevadas de los herbicidas aplicados (32X). Los ensayos de dosis-respuesta muestran, así, que la población R es altamente resistente a los tres herbicidas ensayados (imazetapir, clorimurón-etil y diclosulam). Como puede observarse en la Tabla 3, los factores de resistencia (FR) resultaron más elevados para imazetapir y diclosulam, rondando las 10 unidades para clorimurón-etil, lo cual podría justificarse por una sensibilidad reducida de la población r a este herbicida (Figura 2B y 2E).

Los resultados de esta sección permiten confirmar que la población R presenta resistencia cruzada a tres herbicidas inhibidores de la ALS pertenecientes a diferentes familias químicas: imidazolinonas (IMI) para el caso del imazetapir, triazolopirimidinas (TP) para el caso de diclosulam y sulfonilureas (SU) para el caso del clorimurón-etil.

Interesantemente, la población R mostró valores de biomasa significativamente superiores a la población r en ausencia de tratamiento con herbicidas (200% más), lo cual no daría indicios de que exista un costo asociado a la resistencia, sino más bien lo contrario. No obstante, al tratarse de biotipos de orígenes tan distantes no es posible pensar en un background genético común, condición que resulta indispensable para evaluar penalidades en el ajuste adaptativo o aptitud de una población (Vila-Aiub et al., 2015). En otras palabras, la diferencia en la producción de biomasa observada entre los controles de las poblaciones R y r podría ser consecuencia de una diferente tasa de crecimiento vegetativo entre los dos biotipos bajo las condiciones de crecimiento utilizadas, no necesariamente vinculada al factor de resistencia sino a un vagaje genético (e incluso, epigenético) diferente. Futuros estudios serán necesarios para establecer si existe o no un costo asociado a la resistencia en la población R.

Tabla 3. Parámetros de las curvas dosis-respuesta. Los valores de GR₅₀ (inhibición del crecimiento media) y DL₅₀ (dosis letal media) están expresados en g i.a./ha. Los factores de resistencia (FR) representan el cociente entre los parámetros de GR₅₀ y DL₅₀ de las poblaciones R y r. R² representa el coeficiente de determinación del ajuste utilizado. Las letras en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas para cada herbicida entre las poblaciones ensayadas.

Herbicida	Población	<i>Peso seco</i>			<i>Supervivencia</i>		
		GR ₅₀	FR	R ²	DL ₅₀	FR	R ²
Imazetapir	R	2996 ± 206,0 ^a	>788	0,99	2288 ± 135 ^a	211	0,98
	r	3,8 ± 0,6 ^b		0,96	10,82 ± 2,82 ^b		0,97
Clorimurón-etil	R	>800	>9,3		>800	>11	
	r	86,2 ± 12,5		0,99	73 ± 17		0,98
Diclosulam	R	4397 ± 3214 ^a	600	0,99	>960	>78	
	r	7,32 ± 0,82 ^b		0,96	12,2 ± 1,5		0,97

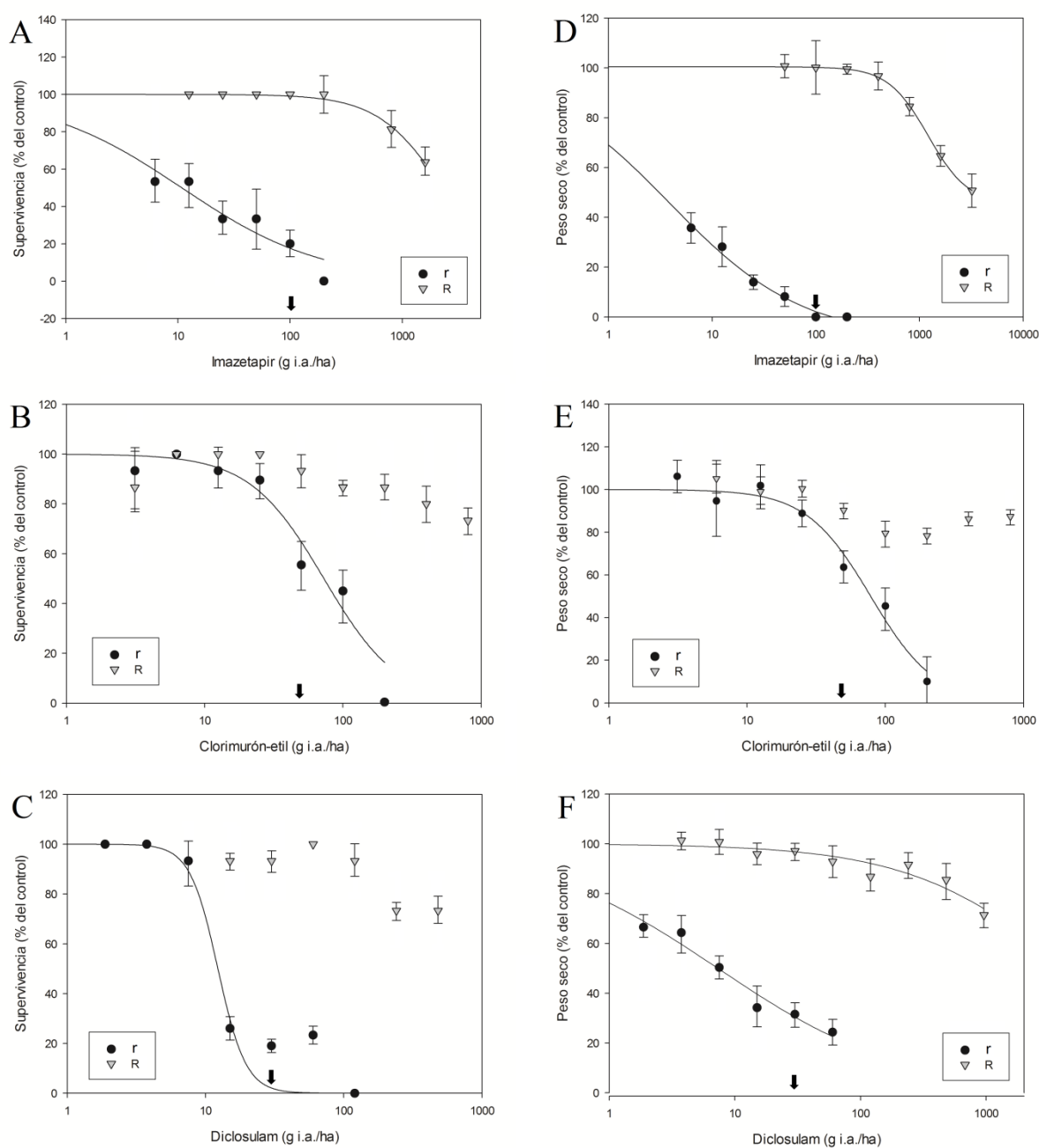


Figura 2. Curvas dosis-respuesta *in vivo* con inhibidores de la ALS en *A. palmeri*. Los resultados se expresan como porcentaje de supervivencia (A-C) y peso seco (D-F) relativo a los controles no tratados. En algunos casos (B, C y E) las dosis del herbicida aplicado no provocaron una reducción sustancial de las variables en estudio, lo cual imposibilitó el ajuste de los datos a la curva paramétrica. Las flechas sobre el eje x indican la dosis aplicada a campo (1X) de cada principio activo.

2.3.1.2 Ensayos de actividad enzimática *in vitro*

En lo que respecta a la medición de actividad ALS *in vitro*, la selección en placa resultó en un método rápido y sencillo para descartar plantas segregantes del biotipo R resistente (Figura 3). Aquellas plántulas que mostraron un retardo en el crecimiento y una pérdida de pigmentación no fueron utilizadas para la obtención de extractos crudos y posterior medición de actividad. Inicialmente, es interesante resaltar que no hubo diferencias significativas en los niveles de actividad ALS entre las poblaciones R y r en ausencia de herbicidas. La actividad específica de los controles sin tratamiento se encontró en el rango de 0,02-0,04 U/mg, similar a los valores reportados para extractos crudos de otras especies (Forlani *et al.*, 1991; Durner *et al.*, 1991). Sobre la base de los valores de I_{50} obtenidos (Tabla 4) obtenidos a partir de las curvas de inhibición enzimática (Figura 4), se puede afirmar que la población R tiene una isoforma de la enzima ALS con una sensibilidad reducida a los tres herbicidas testeados, comparado con la población r. De acuerdo a los FR, estos niveles son altos para imazetapir (36,68 veces), moderados para clorimurón-etil (6,53 veces) y bajos pero significativos para diclosulam (2,27 veces). Estos resultados sientan una evidencia importante para fortalecer la hipótesis sobre la presencia de mecanismos de resistencia asociados al sitio de acción en esta población.

Tabla 4. Parámetros de las curvas de actividad ALS. El I_{50} (inhibición de la actividad enzimática media) se expresa en μM . Los factores de resistencia (FR) representan el cociente entre los valores de I_{50} de las poblaciones R y r. Las letras en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas para cada herbicida entre las poblaciones ensayadas.

Herbicida	Población	Parámetros		
		I_{50}	FR	R^2
Imazetapir	R	$17,50 \pm 9,09^a$	33,68	0,95
	r	$0,5196 \pm 0,3418^b$		0,97
Clorimurón-etil	R	$0,0098 \pm 0,0020^a$	6,53	0,98
	r	$0,0015 \pm 0,0004^b$		0,99
Diclosulam	R	$0,0136 \pm 0,0032^a$	2,27	0,98
	r	$0,0060 \pm 0,0006^b$		0,98

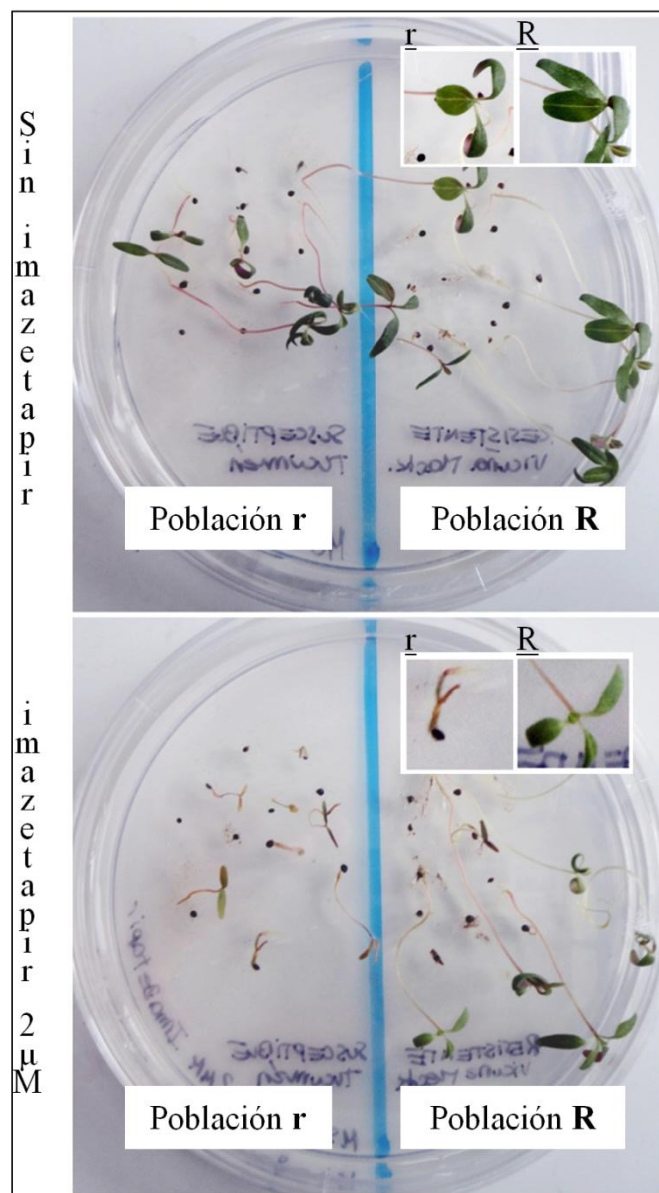


Figura 3. Germinación y selección en placa de plantas resistentes de la población R. Las semillas fueron sembradas en medios no selectivos y selectivos (imagen superior e inferior, respectivamente). Las plantas sobrevivientes fueron trasplantadas a macetas y utilizadas para ensayos de actividad ALS.

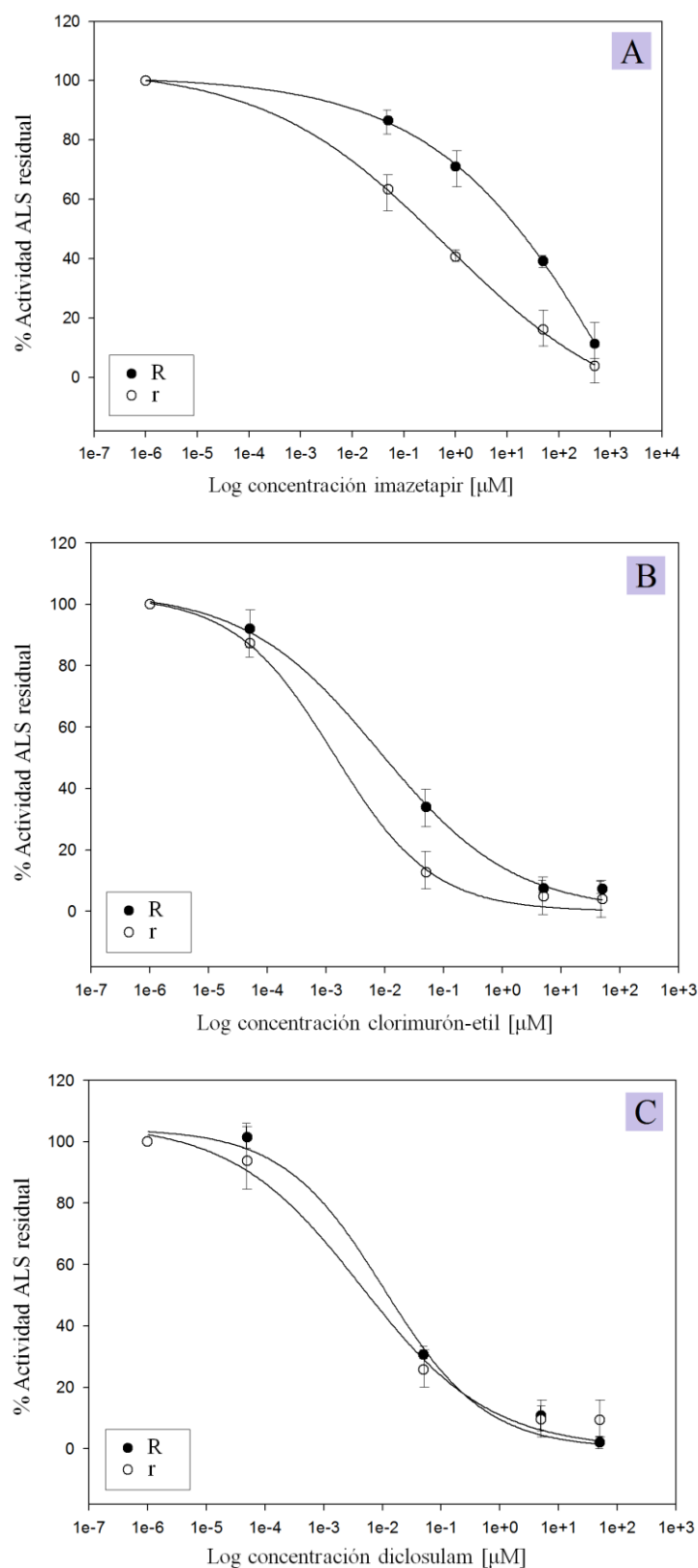


Figura 4. Curvas de actividad enzimática *in vitro* con inhibidores de la ALS sobre extractos crudos de hoja de *A. palmeri*. Los resultados se expresan en porcentaje de actividad residual relativa a los controles no tratados, para las poblaciones R y r en presencia de imazetapir (A), clorimurón-etil (B) y diclosulam (C).

2.3.1.3 Mecanismos moleculares de la resistencia a inhibidores de la ALS

El estudio de las secuencias de clones individuales permitió un análisis comparativo entre la variabilidad de los alelos *als* presentes en las poblaciones R y r. Todas las secuencias ALS de la población r presentaron una identidad aminoacídica del 100%, mientras que las secuencias de la población R presentaron polimorfismos nucleotídicos que se tradujeron en sustituciones a nivel proteína. Todas las sustituciones encontradas en el marco abierto de lectura se encuentran listadas en la Tabla 5, así como también los números de acceso para las secuencias completas cargadas en las bases de datos del NCBI. Se encontraron cuatro versiones alélicas para el gen *als* dentro de la población resistente. A pesar de haber trabajado con muestras de ADN genómico provenientes de varias plantas, esta variabilidad resulta bastante elevada, sobre todo si se considera que *A. palmeri* es una especie diploide con una sola copia del gen *als* (Ferguson *et al.*, 2001). Sin embargo, este hecho podría estar explicado por diversos factores tales como la alta presión de selección ejercida por el control químico, la naturaleza de polinización cruzada obligada de esta especie y la gran cantidad de mutaciones capaces de conferir resistencia a inhibidores ALS dentro del gen en estudio (McCourt *et al.*, 2006).

En la población R, el reemplazo de un triptófano por una leucina en la posición 574 de la cadena polipeptídica fue encontrado en dos de los clones (R1 y R2, Figura 5B). Debido a la adopción más tardía de los herbicidas de la familia de las TP (triazolopirimidinas), esta sustitución ha sido frecuentemente asociada a la resistencia a IMI y SU (Tranel y Wright, 2002), aunque actualmente se la conoce como una sustitución que confiere resistencia de amplio espectro a todas las familias de herbicidas inhibidores de la ALS (Beckie y Tardif, 2012). Así, esta mutación podría por sí misma explicar la resistencia cruzada observada en la población R.

Tabla 5. Diferencias de aminoácidos detectadas en el marco abierto de lectura de la ALS de *A. palmeri* resistente (R) respecto al control susceptible (r). Las mutaciones previamente reportadas se encuentran resaltadas en negrita. Los amino ácidos están numerados de acuerdo a la secuencia ALS de *A. thaliana*, a excepción de la A282D, que fue numerada de acuerdo a *Amaranthus retroflexus* ya que cae en una región ausente en la secuencia de *A. thaliana*.

Población	Versión alélica (y frecuencia)	Sustitución ALS	Número de Acceso (GenBank)
r	A (8/8)	–	KY781916
R	A (1/8)	–	
	B (5/8)	A282D	KY781917
	C (1/8)	W574L	KY781918
	D (1/8)	W574L – M601I	KY781919

Tardif et al. (2006) encontraron que la sustitución W574L provocaba efectos pleiotrópicos en el crecimiento y desarrollo de plantas de la especie *A. powellii*. Sin embargo, la ausencia de una reducción en la biomasa o en la actividad ALS en las plantas R respecto de la plantas r en ausencia de herbicidas, no brindó ningún indicio para sospechar de algún costo en la aptitud de la población en estudio asociado a la resistencia. Aún así, como se mencionó anteriormente, es necesario un enfoque metodológico más complejo para asociar un costo a una resistencia de manera inequívoca (Vila-Aiub *et al.*, 2009).

Dos sustituciones no reportadas previamente fueron encontradas fuera de los dominios conservados de la ALS de la población R (Sibony et al., 2001). Una de ellas, la sustitución A282D, fue encontrada en una alta frecuencia (5/8 clones, Tabla 5), pero la misma se localiza dentro de una región poco conservada, cercana a un fragmento ausente en la secuencia de referencia de *A. thaliana* (clon R3, Figura 5A). Por otro lado, la sustitución M601I apareció en uno de los clones, acompañada de la sustitución W574L (clon R2, Figura 5C). A pesar de que es probable que estos cambios representen simplemente una variación genética natural, no se puede descartar algún tipo de contribución de las mismas al fenotipo de resistencia observado. La caracterización *in vivo* de líneas homocigotas purificadas conteniendo cada una de las sustituciones encontradas por separado, permitiría dilucidar si las sustituciones A282D y M601I encontradas efectivamente contribuyen en algún grado a la resistencia.

Estos resultados moleculares muestran, por primera vez, la presencia de un mecanismo de resistencia a inhibidores ALS asociado al sitio de acción en una población de *A. palmeri* detectada en Argentina recientemente.

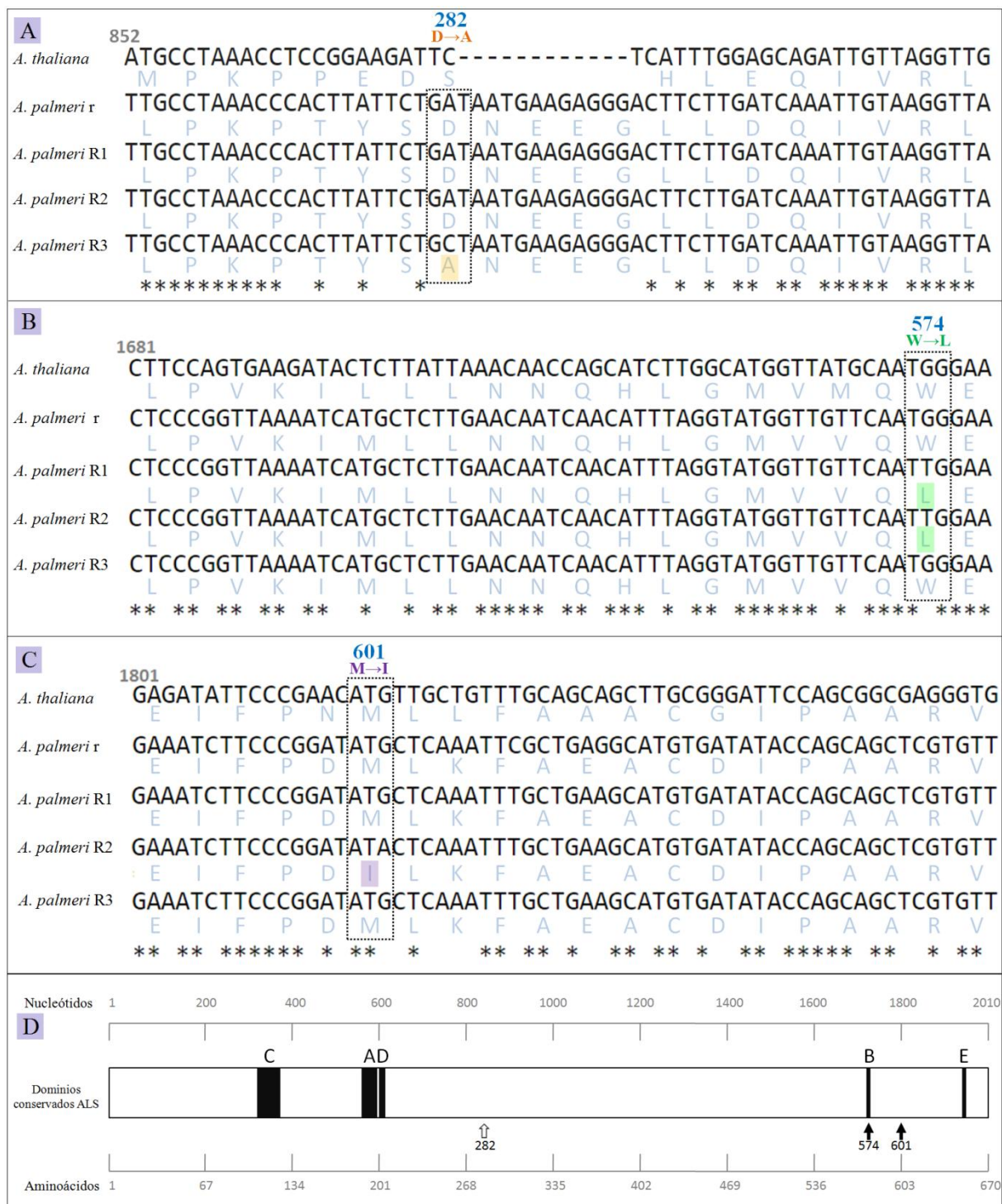


Figura 5. Apilamiento consenso de nucleótidos y de aminoácidos entre las secuencias de las poblaciones R y r de *A. palmeri*. Las sustituciones encontradas en la población R fueron las siguientes: D282A (A), W574L (B) y M601I (C). Sólo la sustitución en la posición 574 cae dentro de los dominios conservados de la acetolactato sintasa (D).

2.3.2 Resistencia a glifosato

2.3.2.1 Ensayos dosis-respuesta *in vivo*

Las curvas de dosis-respuesta indican que tanto la biomasa seca como la tasa de supervivencia en las poblaciones r y R son significativamente mayores que para la población S cuando las plantas son expuestas a dosis crecientes de glifosato (Figura 6). Las dosis de glifosato utilizadas permitieron un buen ajuste de las curvas (Ver valores de R^2 en Tabla 6). Los factores de resistencia, calculados como los cocientes entre los GR_{50} y DL_{50} de las poblaciones resistentes y la población susceptible, variaron entre 24,5 y 47,2 para biomasa seca y entre 28,0 y 116,9 para supervivencia (Tabla 6), indicando altos niveles de resistencia a glifosato en estas poblaciones ($FR > 10$, según criterio consensuado por la Weed Science Society of America). Sin embargo, es importante resaltar que la población S fue marcadamente susceptible a glifosato ($DL_{50} = 10,6$ y $GR_{50} = 28,3$, Tabla 6), produciendo así altos FR que podrían estar sobrestimando los niveles de resistencia de las poblaciones r y R. Las población R resultó significativamente más resistente que la población r ($p\text{-value} < 0.001$). Estos resultados confirman la sospechada resistencia a glifosato en estas poblaciones.

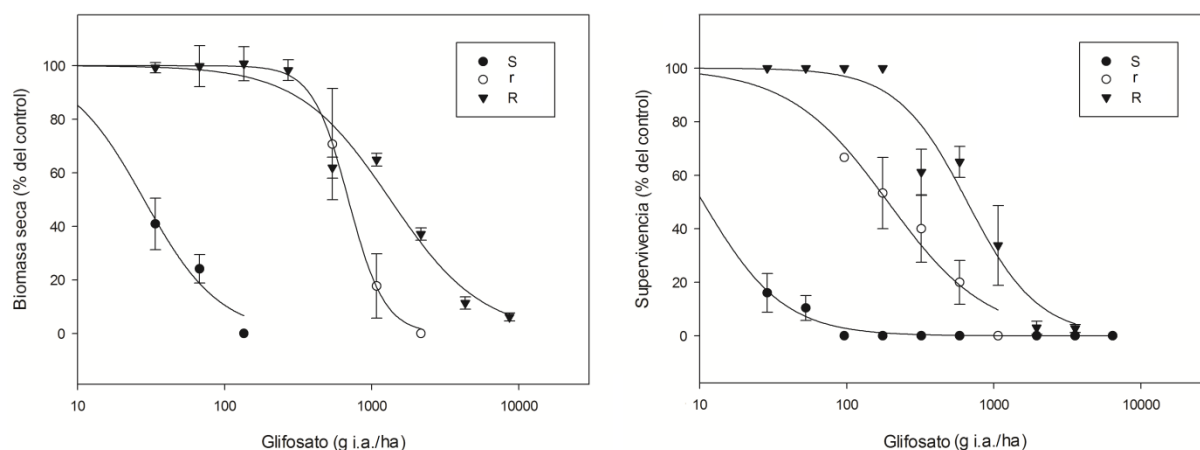


Figura 6. Curvas dosis-respuesta con glifosato en las poblaciones de *A. palmeri*. Las plantas de las poblaciones S, r y R fueron sometidas a la aplicación de dosis crecientes de glifosato. Los resultados se expresan como porcentaje de biomasa seca (A) y supervivencia (B) respecto de los grupos controles no tratados.

Tabla 6. Parámetros de las curvas de dosis-respuesta. Los valores de GR₅₀ (inhibición del crecimiento media) y DL₅₀ (dosis letal media) están expresados en g i.a./ha. Los factores de resistencia (FR) representan el cociente entre los parámetros de GR₅₀ y DL₅₀ de las poblaciones R y r respecto de la población S. R² representa el coeficiente de determinación del ajuste utilizado. Las letras en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones ensayadas.

Población	Supervivencia			Peso seco		
	DL ₅₀	FR	R ²	GR ₅₀	FR	R ²
S	10,6 ± 2,7 ^a		0,99	28,3 ± 5,1 ^a		0,99
r	297,0 ± 38,9 ^b	28,0	0,98	694,1 ± 10,0 ^b	24,5	0,99
R	1239,3 ± 172,4 ^c	116,9	0,96	1336,8 ± 171,1 ^c	47,2	0,97

2.3.2.2 Mecanismos moleculares de la resistencia a glifosato

En lo que respecta al estudio de los mecanismos moleculares causantes de la resistencia a glifosato, se abordaron los dos mecanismos de RT mayoritariamente reportados para especies del género. Como se muestra en la Tabla 7, se estudió la prevalencia de la sustitución P106S y la amplificación del gen *epsps* en cada población mediante las técnicas dCAPS y qPCR, respectivamente.

La sustitución P106S estuvo presente en todas las plantas analizadas de las poblaciones r y R. El ensayo de dCAPS indicó que todas las plantas de la población r eran homocigotas para la sustitución P106S, mientras que en la población R algunas resultaron homocigotas y otras heterocigotas (Tabla 7). En el gel de agarosa mostrado en la Figura 7 se pueden observar los diferentes patrones de digestión obtenidos en la población R. Estos resultados fueron confirmados por secuenciación, como puede observarse en la Figura 8. Las secuencias parciales del gen *epsps* fueron depositadas en el GenBank bajo los números de acceso MK069608 (S106) y MK069609 (P106).

Resulta interesante resaltar que algunas plantas de la población R, además de la P106S, presentaron simultáneamente una amplificación génica leve pero significativa (Figura 9, Tabla 7). No hay indicios para sospechar de la presencia de mecanismos de resistencia desconocidos en estas especies, aunque no puede descartarse la presencia de mecanismos no asociados al sitio de acción, como ha sido recientemente reportado para poblaciones de *A. palmeri* en México (Dominguez-Valenzuela et al., 2017).

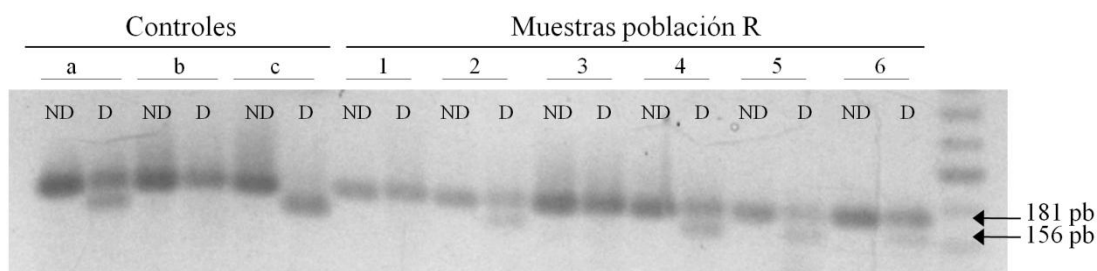


Figura 7. Ensayo dCAPS desarrollado para sustituciones en la P106 de la EPSPS de *A. palmeri*. ADN control de muestras secuenciadas de *A. palmeri* fueron incluidos para validar la fidelidad del test: heterocigotas para la sustitución P106S (a), homocigotas para la sustitución P106S (b) y homocigotas wild-type (c). ND: Muestra no digerida; D: Muestra digerida. La secuencia salvaje (wt) produce una banda única digerida de 156 pb, mientras que la mutante en la posición 106 es insensible a la digestión y produce una banda no digerida de 181 pb. Las muestras 1 y 3 de la población R resultaron homocigotas para la sustitución, mientras que las muestras 2, 4, 5 y 6 resultaron heterocigotas para la misma.

Tabla 7. Mecanismos moleculares de la RG. La sustitución P106S fue detectada en todas las plantas de las poblaciones r y R de *A. palmeri*, mientras que sólo dos plantas de la población R presentaron un aumento significativo en el número relativo de copias del gen *epsps* (marcados con *). P y S indican un residuo de Prolina o de Serina en la posición 106 de la EPSPS, respectivamente.

Población	Planta	dCAPS	Nº relativo de copias <i>epsps</i>
S	1	PP	1.0
S	2	PP	1.0
S	3	PP	1.0
S	4	PP	1.0
S	5	PP	1.0
S	6	PP	1.0
r	1	SS	1.8
r	2	SS	1.0
r	3	SS	1.4
r	4	SS	1.2
r	5	SS	1.4
r	6	SS	1.1
R	1	SS	1.8
R	2	PS	1.1
R	3	SS	1.6
R	4	PS	2.9*
R	5	PS	1.0
R	6	PS	3.4*

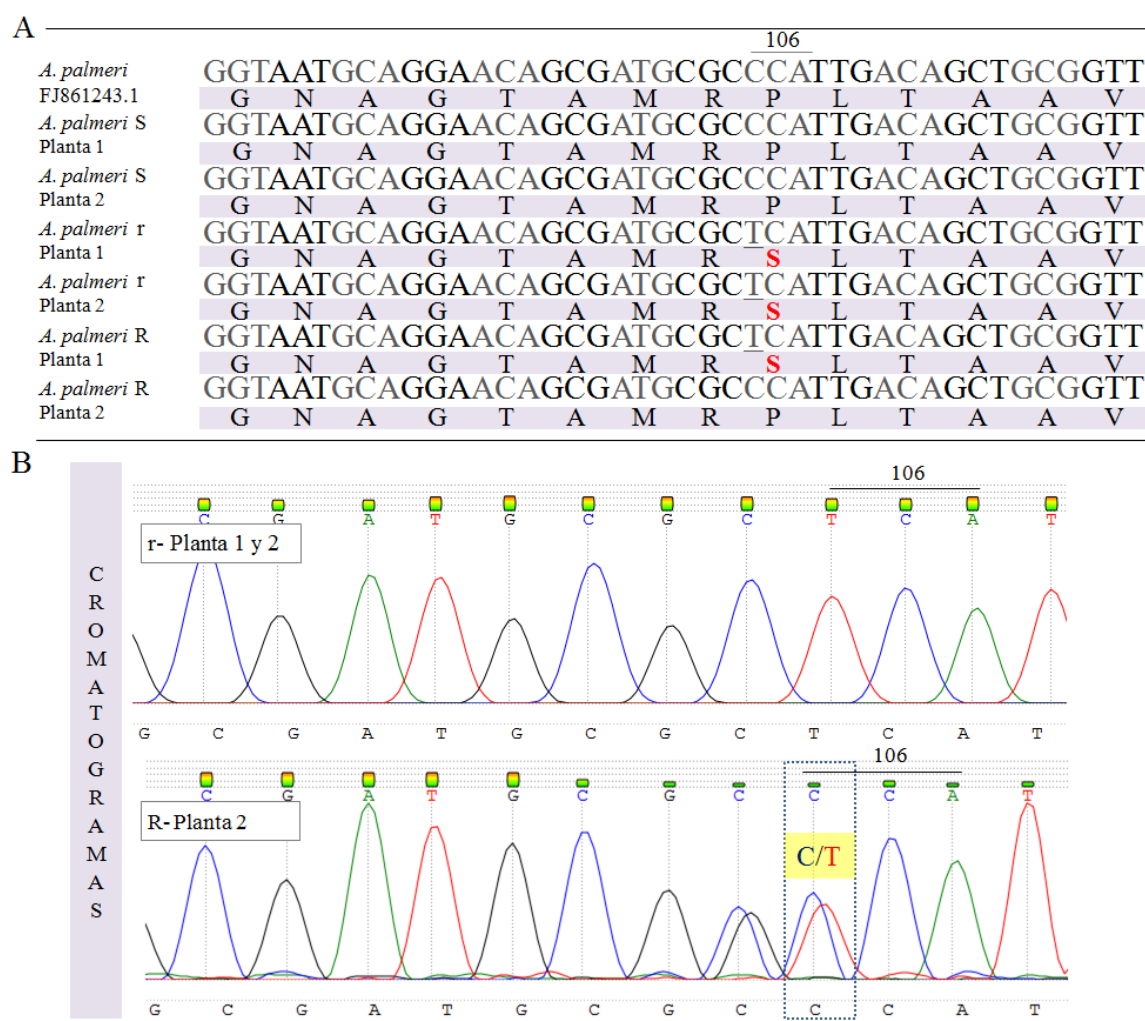


Figura 8. Alineamiento de las secuencias parciales del gen *epsps*. A: El análisis de las secuencias permitió la detección de polimorfismos en la región cercana al aminoácido 106 de la EPSPS (numerado de acuerdo a *Zea mays*). Se detectó la sustitución P106S en todas las plantas de las poblaciones r y R. B: Los cromatogramas muestran que las plantas de la población r resultaron homocigotas para la sustitución, mientras que algunas plantas de la población R (como la planta 2) resultaron heterocigotas, lo cual es consistente con los resultados observados mediante la técnica dCAPS.

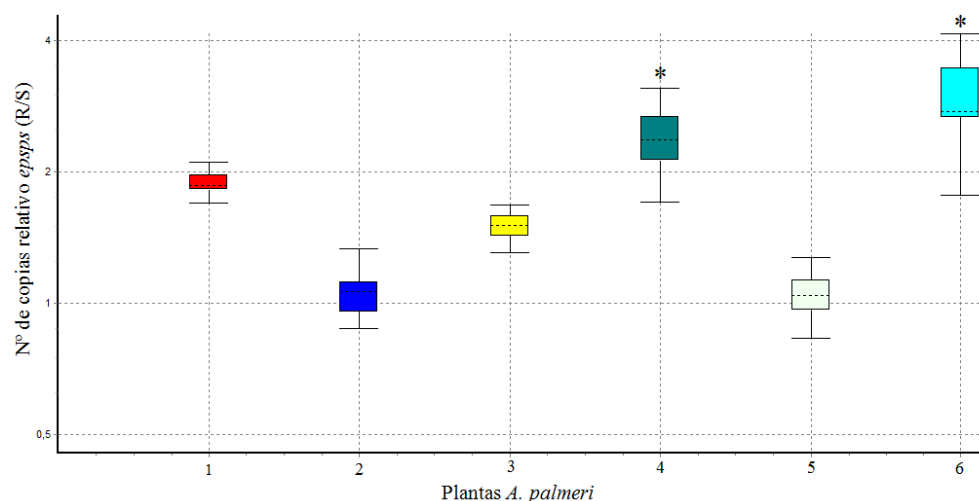


Figura 9. Estudio del mecanismo de amplificación del gen *epsps*. El número relativo de copias del gen *epsps* fue determinado por PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados fueron normalizados utilizando las determinaciones de las muestras S como referencia. Las barras verticales representan el error estándar de la media. *Indica diferencias estadísticamente significativas según el test de aleatorización del software REST.

Estos resultados representan la primera caracterización de la resistencia a glifosato en poblaciones de *A. palmeri* de Argentina, y el segundo caso de reporte de la sustitución P106S en esta especie en todo el mundo (Dominguez-Valenzuela et al., 2017). Adicionalmente, estos resultados complementan la caracterización de la resistencia a inhibidores de la ALS en la población R, oriunda de la localidad de Vicuña Mackenna. En este contexto, es importante mencionar que la resistencia múltiple a glifosato y a herbicidas inhibidores de la ALS se ha expandido fuertemente en toda la región Pampeana, limitando las estrategias de control químico a la rotación y/o mezcla de herbicidas con unos pocos sitios de acción adicionales, como los son los inhibidores de la PPO, del Fotosistema II y las auxinas sintéticas (REM, 2019; Lloret, 2016; Chahal et al., 2015). La integración de prácticas de control no químicas a los programas de manejo de malezas es una necesidad emergente en los sistemas de producción agropecuaria locales, especialmente si se pretende disminuir la tasa de evolución de malezas resistentes a herbicidas y evitar el surgimiento de nuevos mecanismos de resistencia.

2.4 CONCLUSIONES

A través de la metodología aplicada, fue posible confirmar la resistencia a glifosato en una población de *A. palmeri* (r) y la resistencia cruzada y múltiple a inhibidores de la ALS de tres familias químicas y a glifosato en otra población de *A. palmeri* (R). Estos estudios comprenden el primer reporte de mecanismos de resistencia asociados al sitio de acción para esta especie en Argentina. Producto de esta investigación, se encontró que la población R de la localidad de Vicuña Mackenna presenta la previamente reportada sustitución W574L en la secuencia de la ALS, causante de altos niveles de resistencia a todas las familias de inhibidores de dicha enzima. Adicionalmente, tanto la población R de Vicuña Mackenna como la población r de Tucumán, fueron caracterizadas en la resistencia a glifosato, detectando una alta prevalencia de la sustitución P106S. Algunas plantas de la población R presentaron, simultáneamente, una amplificación baja pero significativa en el número relativo de copias del gen *epsps*, sugiriendo que éste podría ser un mecanismo emergente en dicha población y podría agravar el problema de la resistencia a glifosato en el corto plazo. Los resultados obtenidos permitieron confirmar la hipótesis de trabajo planteada en 2.1.



Planta de Amaranthus hybridus resistente a glifosato

CAPÍTULO 2

Los resultados descriptos a continuación fueron producto de la colaboración con otros miembros del laboratorio de Biología Molecular de la FCA-UNR y con miembros del grupo de la Cátedra de Malezas de la FCA-UNR. Mis agradecimientos para ellos. En especial, a la Dra. y Profesora Valeria Perotti, a las Lic. Valeria Palmieri, Andrea Martinatto y Florencia Lorenzetti, y a los Profesores Daniel Tuesca y Hugo Permingeat, coautores de los trabajos publicados producto de estos avances.

Publicaciones de referencia

Larran AS, Lorenzetti F, Tuesca D, Perotti VE, Permingeat HR (2018) Molecular mechanisms endowing cross resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Amaranthus hybridus* from Argentina. *Plant Molecular Biology Reporter* 36, 907-912.

Perotti VE¹, **Larran AS**¹, Palmieri VE, Martinatto AK, Tuesca D, Permingeat HR (2018) A novel triple amino acid substitution in the EPSPS found in a high-level glyphosate resistant *Amaranthus hybridus* population from Argentina. *Pest Management Science*.
Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.5303>

CAPÍTULO 2

ESTUDIO DE LAS BASES BIOQUÍMICAS DE LA RESISTENCIA A INHIBIDORES DE LA ALS Y GLIFOSATO EN POBLACIONES DE *Amaranthus hybridus* DE ARGENTINA

3.1 INTRODUCCIÓN

Como ya se ha descrito en detalle anteriormente, la evolución de la resistencia a herbicidas en malezas representa uno de los problemas más desafiantes que enfrenta la agricultura actualmente. A pesar de ser ampliamente aceptado que la presión de selección es el desencadenante de este fenómeno desafortunado (Shaner 2014), el control químico continúa siendo la práctica más utilizada para el manejo de malezas.

Amaranthus hybridus L. es una especie de maleza latifoliada nativa de Sudamérica y es actualmente la más problemática en Argentina (REM, 2019). El primer caso de resistencia a nivel mundial en esta especie fue reportado en 1972, al herbicida atrazina (Heap, 2019). Actualmente, esta especie se ha vuelto resistente a herbicidas con 6 sitios de acción diferentes, y numerosas poblaciones presentando resistencia múltiple han sido caracterizadas (Heap, 2019). A pesar de que los mecanismos de RG han sido descritos en varias especies de este género, hasta ahora, los mecanismos por los cuales *A. hybridus* se ha vuelto resistente a glifosato son completamente desconocidos. En cambio, algunos de los mecanismos de resistencia a inhibidores de la ALS han sido bien caracterizados en esta especie. Ciertas sustituciones en esta enzima, como la A122T, D376E, W574L y S653N, han sido reportadas en poblaciones de *A. hybridus* con resistencia a herbicidas del grupo B (Berger et al., 2016; Maertens et al., 2004; Trucco et al., 2006; Whaley et al., 2006; Whaley et al., 2007). A pesar de que el primer caso de resistencia a inhibidores ALS en *A. hybridus* fue detectado en Argentina en 1996 (Tuesca y Nisensohn, 2001), más de 20 años después aún no existen reportes de los mecanismos que otorgan resistencia en las poblaciones locales.

En este capítulo, se pretende identificar los mecanismos moleculares que subyacen a la resistencia a inhibidores de la ALS y a glifosato en poblaciones de *A. hybridus* colectadas en los últimos 15 años en Argentina.

Objetivo

Examinar las bases moleculares de la resistencia cruzada a herbicidas inhibidores de la ALS en cinco poblaciones de *Amaranthus hybridus* de la región pampeana colectadas en el período 2001-2014, e identificar los mecanismos que causan una inusualmente elevada resistencia a glifosato en una de ellas.

Hipótesis de trabajo

Las poblaciones de *Amaranthus hybridus* colectadas en Argentina entre el 2001 y el 2014 presentan mecanismos de resistencia asociados al sitio de acción que explican la resistencia cruzada a inhibidores de la ALS de diferentes familias químicas y también la resistencia múltiple a estos herbicidas y a glifosato en una de ellas.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Recolección del material vegetal y tratamiento con herbicidas

Las semillas de *A. hybridus* utilizadas en estos estudios fueron colectadas entre el 2001 y el 2014 en siete localidades diferentes donde se detectaron repetidas fallas en el control químico con las dosis recomendadas de imazetapir y/o clorimurón-etil (inhibidores de la ALS), así como de un campo libre de aplicación de herbicidas para utilizar como control susceptible. El muestreo consistió en la toma de inflorescencias de 50 plantas por campo y su combinación para obtener una muestra representativa. Las subpoblaciones se nombraron de acuerdo a la localidad donde fueron cosechadas, como muestra la tabla 8. Estudios previos confirmaron que la población de S-ZA es sensible a los herbicidas inhibidores de ALS y que las poblaciones R-PI y R-BA presentan resistencia cruzada a más de una familia de herbicidas inhibidores de la ALS (Romagnoli et al., 2013; Tuesca y Nisensohn, 2001). La resistencia a imazetapir y clorimurón-etil de las poblaciones restantes (R-VM, R-CA y R-AL) fue confirmada por dos aplicaciones repetidas con dosis 1X sobre 25 plantas. Las poblaciones se clasificaron como resistentes cuando la tasa de supervivencia fue > 50% y como susceptibles cuando la tasa de supervivencia fue <10%, siguiendo el criterio de Yu et al. (2012).

Tabla 8. Poblaciones de *Amaranthus hybridus* estudiadas. Las poblaciones S-ZA y S-HU fueron utilizadas como controles susceptibles para los ensayos de resistencia a inhibidores de la ALS y a glifosato, respectivamente.

Población	Localidad	Coordenadas	R ALS?	R glifosato?
S-ZA	Zavalla	33°00' S 60°53' O	No	¿?
S-HU	Huanchilla	33°39' S 63°38' O	¿?	No
R-PI	Pueblo Italiano	33°53' S 62°50' O	Sí	¿?
R-BA	Baldissera	33°07' S 62°19' O	Sí	¿?
R-VM	Vicuña Mackenna	33°54' S 64°23' O	Sí	¿?
R-CA	Canals	33°33' S 62°53' O	Sí	Sí
R-AL	Aldao	30°58' S 61°44' O	Sí	¿?

Adicionalmente, se sospechaba de una fuerte resistencia al herbicida glifosato en la población R-CA, por lo cual se realizó una confirmación y caracterización *in vivo* de dicha resistencia mediante curvas de dosis-respuesta, utilizando como control susceptible a una población de *A. hybridus* de la localidad de Huanchilla (S-HU). La metodología aplicada para los ensayos de dosis-respuesta fue descrita en la sección 2.2.2.

La progenie de cada población aplicada se creció en cámara de cultivo a 25 °C y un fotoperíodo de 16 h a una intensidad lumínica de 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ hasta alcanzar un estadio de 4-6 hojas. Luego, se extrajo ADN genómico a partir del tejido foliar de un número determinado de plantas, según lo indicado en cada uno de los experimentos detallados en las secciones siguientes. Para el caso del estudio de la resistencia a glifosato, todos los ensayos (a excepción de la curva dosis-respuesta y la estimación de frecuencia genotípica) se llevaron a cabo sobre ocho plantas provenientes de la autopolinización de una planta R-CA sobreviviente a una dosis 1X de glifosato, que fueron llamadas plantas R-CA₁.

3.2.2 Mecanismos moleculares de la resistencia a inhibidores de la ALS

3.2.2.1 Clonado y secuenciación del gen *als*

La metodología aplicada fue idéntica a la descrita para *A. palmeri* en la sección 2.2.3.2 del capítulo 1. En este caso, se secuenciaron cuatro plásmidos conteniendo versiones alélicas del gen *als* para cada población y los resultados fueron analizados en el software bioinformático Unipro Ugene, de acuerdo a lo descrito en la sección 2.2.3.3.

3.2.3 Estudio de la resistencia a glifosato

3.2.3.1 Ensayo de acumulación de shikimato

Inicialmente, se cortaron diez discos de 4 mm de diámetro de hojas jóvenes de ocho plantas S-HU y ocho plantas R-CA₁. Éstos fueron depositados en frascos de vidrio de 20 mL (viales) conteniendo 1 mL de una solución de fosfato monobásico de amonio 10 mM pH 4,4 y 0,1% v/v de Tween 80, de acuerdo al protocolo descrito por Shaner et al. (2005). Un volumen de 10 μL de una solución de glifosato fue agregado de manera de lograr concentraciones finales de 200, 400 y 800 μM , mientras que a los viales control se les agregó un volumen equivalente de agua destilada. Los viales fueron tapados y transferidos a una cámara de cultivo donde se incubaron en luz (150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) durante 16 hs. Luego de dicha incubación, se adicionaron 250 μL de HCl 1,25 M y los viales se congelaron hasta la medición de ácido shikímico. Los niveles de shikimato fueron determinados

espectrofotométricamente según lo descrito por Cromartie y Polge (2000). La absorbancia de midió a 380 nm en un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda Bio+ y los valores fueron convertidos a ng de ácido shikímico por g de peso fresco utilizando una curva estándar de shikimato de Sigma-Aldrich. Se realizaron triplicados técnicos para cada tratamiento y el experimento fue repetido dos veces. Los valores obtenidos fueron sometidos a un análisis de la variancia (ANOVA) unifactorial en el software Sigma-Plot y las diferencias estadísticamente significativas se estimaron mediante el test de Holm-Sidak con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$).

3.2.3.2 Secuenciación parcial del gen *epsps*

Se extrajo ADN genómico de ocho plantas S-HU y ocho plantas R-CA₁, se amplificó y se secuenció un fragmento del gen *epsps*, según lo descrito en la secciones 2.2.4.1 y 2.2.4.2. Las secuencias fueron analizadas con el software bioinformático Unipro Ugene, según lo descrito en la sección 2.2.3.3.

3.2.3.3 Búsqueda de sustituciones en la Prolina 106

Con el objetivo de determinar la cigosis de posibles mutaciones causantes de sustituciones en la P106 se aplicó la técnica de dCAPS sobre muestras de ADN genómico de ocho plantas S-HU y ocho plantas R-CA₁, aplicando la metodología descrita en la sección 2.2.4.1.

3.2.3.4 Número relativo de copias del gen *epsps*

El número relativo de copias del gen *epsps* en la población R-CA₁ respecto de la población R-HU fue estudiado mediante PCR cuantitativa en tiempo real, según el protocolo descrito en la sección 2.2.4.3.

3.2.3.5 Extracción de ARN y síntesis de ADN copia

Se extrajo ARN de hojas jóvenes de ocho plantas S-HU y ocho plantas R-CA₁ utilizando el kit comercial Plant Total RNA (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del

manual. Se agregó un paso adicional de tratamiento con DNasa (desoxirribonucleasa) que consistió en el agregado de una unidad enzimática por reacción durante 20 minutos a 25 °C. El ARN obtenido fue disuelto en agua destilada estéril y fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda Bio+. Su integridad y calidad fue chequeada adicionalmente por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Finalmente, se realizó la síntesis del ADN copia (ADNc) a 42 °C durante 1 hora en un volumen de reacción de 25 µL conteniendo 0,25 µg de ARN molde, 200 pmol de oligo(dT) (Biodynamics) y 200 U de la transcriptasa reversa M-MLV de Promega.

3.2.2.6 Estudio de los niveles de expresión del gen *epsps*

Se utilizó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real para estudiar los niveles de expresión del gen *epsps* con respecto a un gen de referencia, en este caso el gen *als*. Se utilizaron los oligonucleótidos Af (5'-GCTGCTGAAGGCTACGCT-3') y Ar (5'-GCGGGACTGAGTCAAGAAGTG-3') (que amplifican un producto de 118 pb). Las reacciones fueron preparadas en un volumen final de 13 µL, conteniendo 200 nM de los oligonucleótidos específicos, 1X de RealMix qPCR de Biodynamics y 0,5 µL de ADNc. Al menos tres réplicas biológicas fueron procesadas por triplicado técnico. El protocolo de amplificación y el análisis de los resultados fueron conducidos como se describe en la sección 2.2.4.3. Las medidas de cuantificación relativa fueron utilizadas para expresar los resultados como el número de veces en que la expresión del gen *epsps* se vio modificada.

3.2.2.7 Extracción de ADN genómico de semilla única

Se desarrolló un protocolo para la extracción de ADN genómico de semillas de especies de *Amaranthus*. El mismo consistió en la hidratación de las semillas en agua destilada durante una noche a temperatura ambiente, seguida de la disrupción mecánica con pilón plástico de semillas individuales posicionadas en el fondo de tubos plásticos de 2 mL. Los pasos siguientes consistieron en una versión modificada y acortada del protocolo de extracción con buffer CTAB:

- Adición de 400 µL de buffer CTAB. Agitación en vórtex durante 3 segundos.
- Incubación a 55 °C durante 15 minutos.

-
- Centrifugación a 3000 *g* durante 1 minuto.
 - Adición de 400 µL de cloroformo. Agitación en vórtex durante 5 segundos.
 - Centrifugación a 12000 *g* durante 5 minutos.
 - Transferencia de 300 µL de la fase superior a un tubo conteniendo 300 µL de isopropanol. Mezclado por inversión.
 - Incubación a -20 °C durante 20 minutos.
 - Centrifugación a 12000 *g* durante 10 minutos. Descarte del sobrenadante.
 - Adición del 300 µL de etanol 70% v/v.
 - Centrifugación a 12000 *g* durante 5 minutos. Descarte del sobrenadante.
- Este protocolo no requiere la utilización de nitrógeno líquido ni de centrífuga refrigerada.

3.2.2.8 Análisis de alta resolución de curvas de fusión

Se realizó un estudio de la frecuencia de aparición de una triple sustitución en la EPSPS de la población R-CA (T102I + A103V + P106S, a la cual se denominó TAP-IVS), ya que la misma fue encontrada en las plantas R-CA₁. Las determinaciones se realizaron mediante un análisis de alta resolución de curvas de fusión (o curvas de “melting”), según lo descrito en un trabajo reciente (Barrantes-Santamaría et al., 2018). Los oligonucleótidos utilizados y el protocolo de amplificación de la PCR cuantitativa fueron idénticos a los descritos en la sección 2.2.4.3, utilizando 1 µL de ADN de 130 semillas como molde. Como esta triple sustitución TAP-IVS deriva de tres transiciones C→T, su presencia produce un descenso de 1,2 °C en la temperatura de fusión del fragmento amplificado del gen *epsps* respecto a la secuencia salvaje. En consecuencia, el único pico de las curvas de fusión se mueve de ~84 a ~82.8 °C. Para chequear la habilidad de esta técnica en la detección de variantes heterocigóticas, se crearon muestras heterocigotas artificiales mezclando ADN genómico proveniente de las plantas conteniendo la triple sustitución TAP-IVS y los controles de la población susceptible S-HU (proporción 1:1). Los diferentes patrones de curvas obtenidos (I, II y III, Figura 15A) fueron correlacionados a la ausencia/presencia de la triple sustitución en la EPSPS en homocigosis o heterocigosis. Un subgrupo representativo de muestras (incluyendo algunas con patrones levemente diferentes a los representados en I, II y III) fueron validadas a través de la técnica “dCAPS” (según lo descrito en la sección 2.2.4.1)

para detectar la presencia o ausencia de la secuencia salvaje, y también por secuenciación a través del servicio de Macrogen (Macrogen Inc., Corea).

3.2.2.9 Análisis estructural de la mutante TAP-IVS

Se realizó un modelado estructural utilizando el servidor SWISS-PROT de las secuencias salvajes (wt), doble mutante (TIPS) y triple mutante (TAP-IVS) de la EPSPS de *A. hybridus* a partir de su secuencia de ADNc (patente US20130288895A1). La estructura de la EPSPS de *E. coli* (1G6S PDB) fue utilizada como molde para el modelado de la wt, y la estructura de la EPSPS TIPS de *E. coli* (3FK1 PDB) como molde para las versiones TIPS y TAP-IVS. Fue garantizado, para todos los modelos, un valor RMSD (Root Mean Square Deviation) global menor a 0,2 y una estructura secundaria global similar a la de los moldes. Para analizar en detalle las diferencias del sitio de unión del glifosato a la EPSPS, se determinó la distancia entre dicho ligando y un residuo reportado como clave para la unión (G96 en *E. coli*, equivalente a la G101 en plantas) (Funke et al., 2009) utilizando el software Pymol Molecular Graphics System. Finalmente, se realizó una predicción de los residuos de aminoácidos involucrados en el sitio de unión a glifosato utilizando la aplicación LIDIA del programa COOT (Emsley et al., 2004).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Resistencia a inhibidores de la ALS

Todas las poblaciones presentaron una tasa de supervivencia mayor al 50% luego de las aplicaciones de dosis 1X de imazetapir y clorimurón-etil, con excepción al control susceptible S-ZA. Como no existían secuencias publicadas para el gen *als* en *A. hybridus* previo a estas investigaciones, las secuencias obtenidas fueron alineadas a las del gen *als* de *A. palmeri*. La Figura 10 muestra los alineamientos nucleotídicos y aminoacídicos con los cambios detectados en los dominios conservados de la proteína para cada población resistente. Así, una transversión T→A en la posición 1125 provocó el cambio de un glutamato por un aspartato en la posición 375 de la proteína ALS (correspondiente a la posición 376 en la secuencia de referencia de *A. thaliana*) (Figura 10A) y una transversión G→T en la posición 1718 produjo el reemplazo de un triptófano por una leucina en la posición 573 (correspondiente a la 574 en *A. thaliana*) (Figura 10B). Cada población resistente presentó al menos una de estas dos sustituciones, ambas reportadas como causantes de resistencia de amplio espectro a todos los inhibidores de la ALS, lo cual es consistente con los fenotipos observados. Las sustituciones encontradas en cada población están listadas en la Tabla 9. Las dos sustituciones nunca aparecieron en un mismo alelo. En la Figura 11, se puede observar un mapa de distribución de las poblaciones estudiadas con sus respectivos mecanismos de resistencia a inhibidores de la ALS. Las secuencias completas de los alelos susceptibles y resistentes fueron depositadas en el GenBank bajo los números de acceso MH036304-MH036306.

A pesar de que la resistencia a herbicidas en *A. hybridus* ha sido un problema en Argentina desde 1996 (Tuesca y Nisensohn, 2001), no ha habido hasta el día de hoy estudios que indaguen sobre los mecanismos moleculares responsables de la resistencia cruzada observada en poblaciones locales. Hasta ahora, sólo Berger et al. (2016) han reportado la presencia de la sustitución S653N en dos poblaciones de *A. hybridus* de la provincia de Córdoba. Curiosamente, dos poblaciones de *A. palmeri* -especie reportada en Argentina hace apenas unos años (Morichetti et al., 2013)- fueron descriptas como portadoras de las sustituciones W574L y S653N en la secuencia de la proteína ALS (Larran et al., 2017). A pesar de que Berger et al. (2016) estudiaron la posible hibridación entre poblaciones locales

de *A. hybridus* y *A. palmeri*, no encontraron evidencias para acreditar la ocurrencia de tal fenómeno. Sobre la base del conocimiento de que ambas especies presentan las sustituciones W574L y S653N, parece prudente no descartar una posible hibridación entre poblaciones de estas especies, especialmente si se considera que la transferencia de genes de resistencia a inhibidores ALS desde una especie monoica a otra dioica del género *Amaranthus* ya ha sido descrita (Tranel et al., 2002).

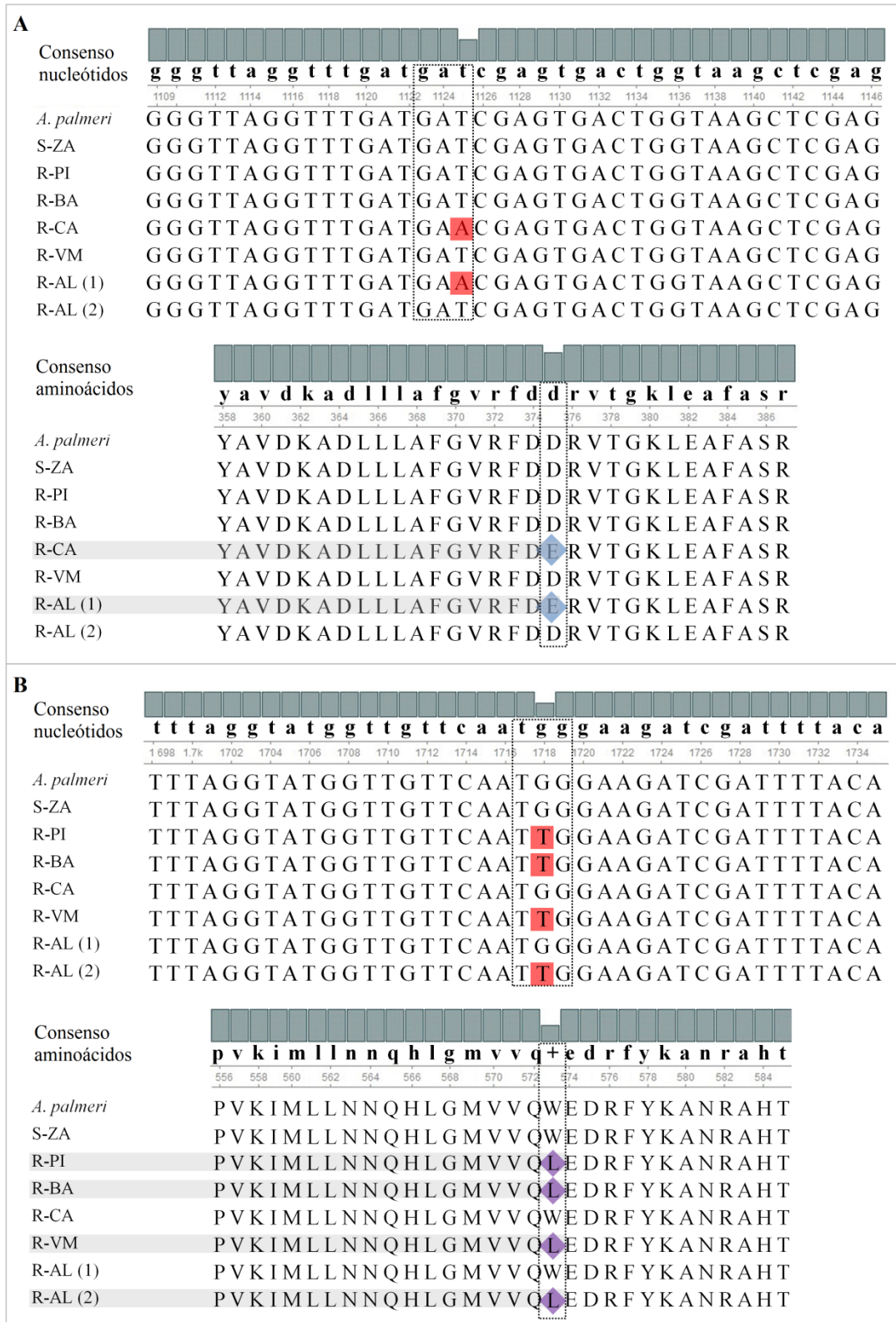


Figura 10. Alineamientos nucleotídicos y aminoácidos de las secuencias correspondientes a la ALS de *A. hybridus* en las posiciones donde se detectaron mutaciones.

Tabla 9. Sustituciones encontradas en el marco abierto de lectura de la ALS de las poblaciones resistentes de *A. hybridus*, numeradas de acuerdo de la secuencia de referencia de *A. thaliana*.

Población de <i>A. hybridus</i>	Sustituciones en la ALS	
	D376E	W574L
S-ZA	-	-
R-BA	-	√
R-PI	-	√
R-CA	√	-
R-VM	-	√
R-AL	√	√

Comprender los mecanismos que entranan la resistencia a herbicidas permite una mejor toma de decisiones a la hora de diagramar programas de manejo. Por un lado, los mecanismos de resistencia limitan el espectro de herbicidas que pueden utilizarse en los programas de rotación. En particular, se conoce que la sustitución S653N causa resistencia alta a herbicidas de la familia de las IMI pero baja o nula a herbicidas de las familias de las SU y TP (Heap, 2019). En cambio, las mutaciones en posiciones 574 y 376 encontradas aquí fueron extensamente reportadas como causantes de resistencia a las cinco familias químicas de inhibidores de la ALS (Whaley et al., 2007), restringiendo las posibilidades de control con herbicidas de dicho modo de acción. Por otro lado, ciertas penalidades en la aptitud o ajuste adaptativo de una población pueden estar asociadas a mecanismos de resistencia, por lo cual las estrategias de manejo deberían apuntar a favorecer la reproducción de las plantas susceptibles promoviendo la ausencia de presión de selección. A pesar de que los costos de *fitness* fueron estudiados correctamente en un número limitado de casos (Vila-Aiub et al., 2015), ciertos efectos pleiotrópicos importantes afectando la morfología y anatomía de la planta fueron asociados a poblaciones ALS-resistentes de *A. powellii* portando la sustitución W574L (Tardif et al., 2006).

Finalmente, la conducción de encuestas tanto para dilucidar la distribución de especies como de mecanismos de resistencia resulta muy útil para la construcción de mapas de riesgo que nos alerten de manera geo-localizada sobre las estrategias que se deberían incorporar o dejar de lado en los programas de manejo de malezas. A pesar de que es dificultoso establecer una hipótesis sobre el origen y dispersión de la resistencia en las poblaciones en estudio, es posible afirmar, al menos, que las mutaciones responsables de la resistencia cruzada están

esparcidas en el sur de las provincias de Córdoba y Santa Fe (Figura 11). Además, si se tiene en cuenta que estas poblaciones fueron cosechadas entre 4 y 17 años atrás, se puede asumir que la resistencia y la frecuencia de estas mutaciones están hoy mucho más extendidas que lo ilustrado por la Figura 11. Consecuentemente, frente a la detección de una subpoblación de *A. hybridus* resistente a la aplicación de cualquier inhibidor ALS en esta región, se recomienda fuertemente la rotación o combinación de herbicidas con un modo de acción diferente, excluyendo al glifosato, ya que esta maleza también se ha vuelto rápidamente resistente a dicho principio activo en gran parte de la zona núcleo de producción de Argentina (Scursoni y Satorre, 2010). Sin embargo, solo la incorporación de estrategias no químicas en los programas integrados de manejo de malezas ayudará a desacelerar la evolución de las malezas resistentes a herbicidas. No se han estudiado mecanismos de resistencia no asociados al sitio de acción en estas poblaciones, por lo tanto, no se puede descartar la presencia de mecanismos de este tipo contribuyendo en cierta medida a los fenotipos de resistencia.

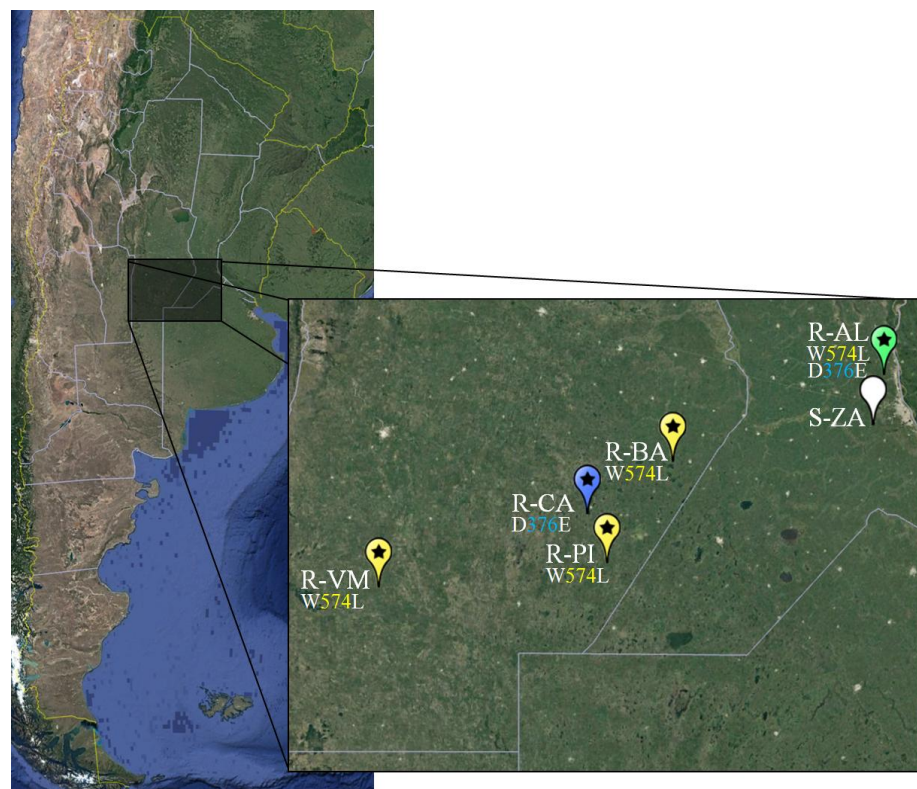


Figura 11. Localización de las poblaciones de *A. hybridus* estudiadas y distribución de los mecanismos de resistencia a inhibidores ALS en Argentina.

3.3.2 Resistencia a glifosato

3.3.2.1 Niveles de resistencia a glifosato en la población R-CA

Los experimentos de dosis-respuesta con glifosato permitieron confirmar la resistencia de la población R-CA. Una gran reducción de la biomasa de la población S-HU fue observada a bajas dosis de glifosato en comparación con la población R-CA (Figuras 12 y 13). El valor de GR₅₀ para la población susceptible fue de 66,6 g i.a./ha, mientras que el de la población resistente fue de 20.900 g i.a./ha, arrojando un factor de resistencia (FR) de 314 (Tabla 10). La población R-CA exhibió un valor de GR₅₀ marcadamente más elevado -específicamente, 19,6 veces- que la dosis de glifosato recomendada por el marbete (540 g i.a./ha). Inclusive, la dosis aplicada más elevada (32X) no fue suficiente para controlar a esta población, en la cual el 100% de las plantas sobrevivieron 21 DDT (días después del tratamiento) y completaron normalmente su ciclo de vida con formación de semillas.



Figura 12. Respuesta al glifosato de plantas de las poblaciones S-HU y R-CA de *A. hybridus*.

Tabla 10. Parámetros de la curva dosis-respuesta. El factor de resistencia (FR) se calculó como el cociente entre los GR₅₀ (inhibición del crecimiento media) de las poblaciones R-CA y S-HU. Las letras en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas.

Población	GR ₅₀	FR	R ²
S-HU	66,6 ± 7,4 ^a		0,96
R-CA	20900 ± 8600 ^b	314	0,75

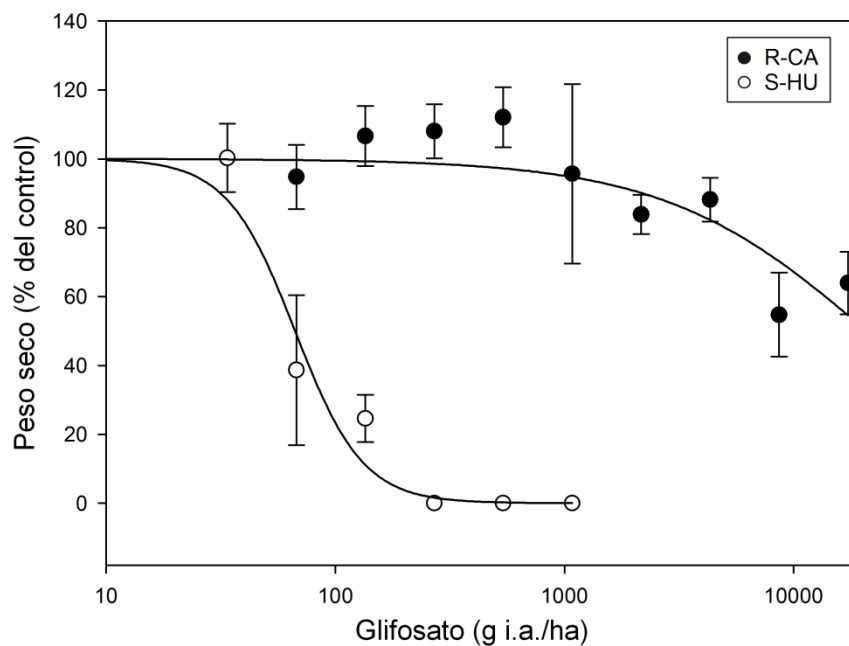


Figura 13. Ensayo de dosis-respuesta. Las plantas de la población S-HU y R-CA fueron sometidas a la aplicación de diferentes dosis de glifosato. Los resultados se expresan como porcentaje de biomasa seca remanente respecto del control sin tratar, para cada población.

3.3.2.2 Acumulación de shikimato

El shikimato se acumula en las plantas cuando la enzima EPSPS es inhibida por glifosato debido a que el shikimato-3-fosfato, uno de sus sustratos, es desfosforilado y convertido a shikimato más rápido de lo que es consumido en otras vías metabólicas (Herrmann y Weaver, 1999). El bioensayo en discos de hoja mostró que las plantas S-HU acumularon shikimato luego del tratamiento con glifosato (variando entre 125-160 µg de ácido shikímico por g de peso fresco), mientras que las plantas R-CA₁ no lo acumularon a ninguna de las concentraciones testeadas (200, 400 y 800 µM) (Figura 14). Estos resultados

son consistentes con una actividad intacta de la enzima EPSPS proveniente de las plantas R-CA₁ en presencia de glifosato, inclusive a la concentración más elevada.

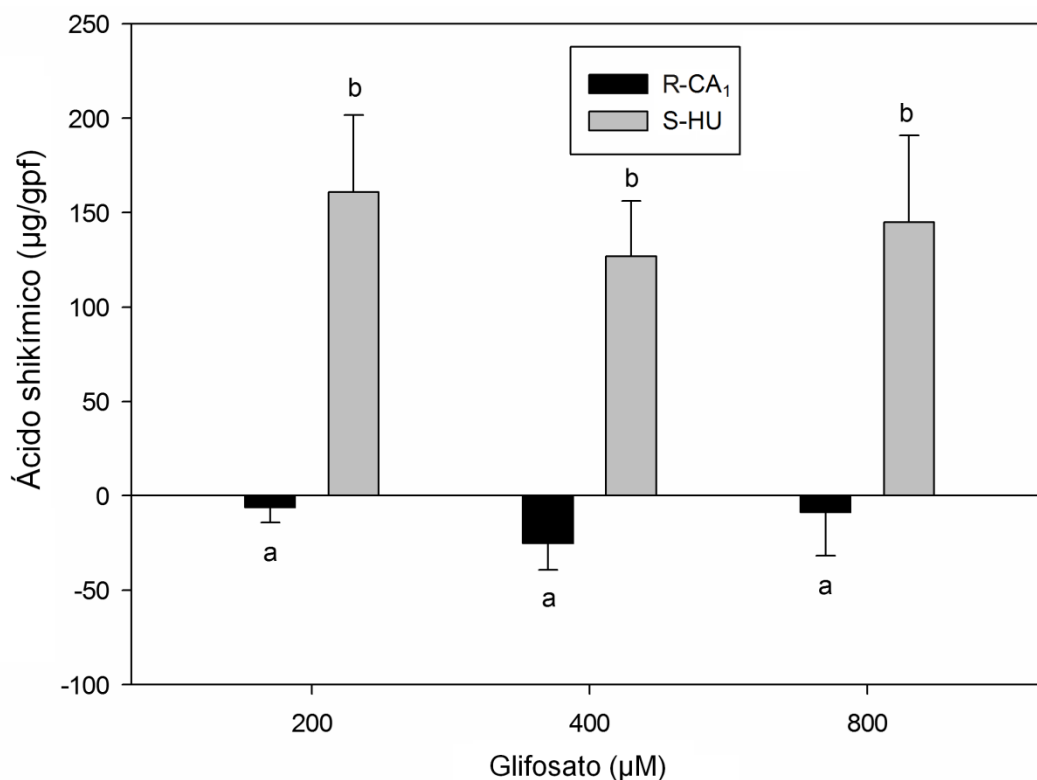


Figura 14. Acumulación de shikimato en hojas de plantas S-HU versus R-CA₁. Los valores se expresan en µg de ácido shikímico por gramo de peso fresco de tejido bajo tres concentraciones de glifosato (200, 400 y 800 µM). Las barras verticales representan el error estándar de la media. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas.

3.3.2.3 Análisis de la secuencia *epsps* de las plantas R-CA₁

Con el objetivo de estudiar la presencia de mutaciones asociadas al sitio de acción en la población resistente de *A. hybridus*, se amplificó mediante PCR una región altamente conservada del gene *epsps* en la cual varias mutaciones han sido reportadas como causantes de resistencia a glifosato (Sammons y Gaines, 2014; Funke et al., 2009). El análisis de las secuencias reveló una triple sustitución aminoacídica en los fragmentos de la EPSPS de todas las plantas R-CA₁ (Figura 15A). La misma es causada por cuatro nucleótidos mutados que producen los siguientes cambios de codones: ACA por ATA (T102I), GCG por GTC (A103V) y CCA por TCA (P106S). Como consecuencia, se produce una triple sustitución a la

cual se denomina TAP-IVS. Estas sustituciones simultáneas ocurriendo en las posiciones 102 y 106 son conocidas como TIPS y su contribución a la resistencia a glifosato ha sido bien caracterizada, e incluso comercialmente utilizada (Lebrun et al., 2003; Arnau et al., 1998; Spencer et al., 2000). Hasta ahora, la evolución natural de esta doble sustitución ha sido documentada sólo en dos especies de malezas (Yu et al., 2015; Alcántara-de la Cruz, 2016a), convirtiendo a esta población de *A. hybridus* en el tercer reporte a nivel mundial. No obstante, la tercera sustitución que aparece, causada por dos mutaciones consecutivas (ver Figura 15A), es, hasta donde se conoce, la primera vez que se reporta. Las secuencias parciales obtenidas fueron depositadas en la base de datos del Gen Bank bajo los números de acceso MH482843 (plantas R-CA₁) y MH482844 (plantas S-HU).

A pesar de que las consecuencias de esta sustitución novedosa en la posición 103 sobre las propiedades cinéticas y regulatorias de la EPSPS no fueron dilucidadas aún, su localización dentro de este dominio tan conservado sugiere que podría tener alguna implicancia en los niveles inusualmente elevados de resistencia que presenta esta población de *A. hybridus*, como discute en secciones posteriores.

Adicionalmente, los ensayos de dCAPS fueron hechos sobre ocho plantas R-CA₁ portando la triple sustitución TAP-IVS para clasificar a las muestras en homocigotas u heterocigotas. Todas las plantas testeadas resultaron homocigotas para dicha sustitución, como puede observarse en la ausencia de digestión en todas ellas (Figura 15B). Dado que *A. hybridus* es una especie esencialmente autógama, la homocigosis puede lograrse en unas pocas generaciones. De cualquier manera, este genotipo es esperable considerando que la sustitución TAP-IVS no es un evento tan reciente en la evolución de la resistencia a glifosato en esta población, como se describirá en la sección 3.2.2.5.

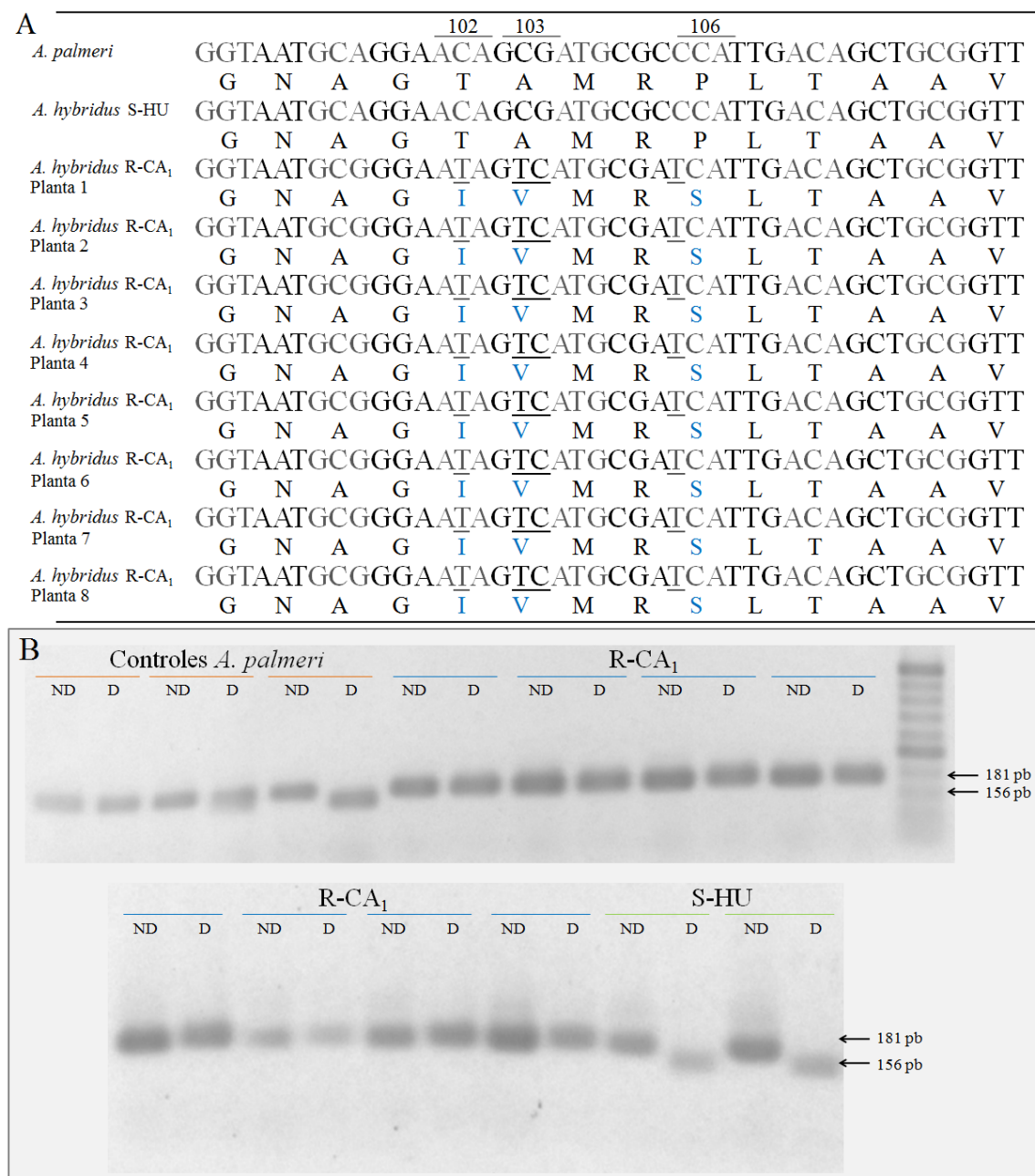


Figura 15. Secuenciación parcial del gen *epsps* y genotipado por dCAPS. A) Análisis del fragmento de secuencia *epsps* en las plantas R-CA. Las cuatro mutaciones encontradas están subrayadas. Los aminoácidos fueron nombrados de acuerdo a la secuencia de *Zea mays*. B) Genotipado por dCAPS desarrollado para la sustitución P106S en *A. hybridus*. ADNs control de muestras secuenciadas de *A. palmeri* (wt, heterocigota y homocigota para la sustitución P106S) fueron incluidos para validar la fidelidad del test. ND: No Digerido; D: Digerido. La secuencia salvaje (wt) produce una banda única digerida de 156 pb (muestras S-HU), mientras que la mutante en la posición 106 es insensible a la digestión y produce una banda no digerida de 181 pb (todas las muestras R-CA₁).

3.3.2.4 Amplificación del gen *epsps*

El incremento en el número de copias de gen *epsps* fue estudiado por PCR cuantitativa en tiempo real. Los individuos de la población S-HU presentaron, en promedio, 1,04 copias del gen *epsps* en relación al gen control *als*, mientras que las plantas de la población R-CA presentaron un leve aumento en el número de copias relativo, que varió entre 1,8 y 3,7 veces (Figura 16A). Sin embargo, la expresión del gen *epsps* a nivel de ARNm no resultó significativamente aumentada en las plantas R-CA₁ (Figura 16B). De manera similar, no se encontró una correlación entre el número de copias y los niveles de expresión en un reporte previo hecho sobre la especie *Bromus diandrus*, caso en el cual fue atribuido a que las copias del gen *epsps* estaban transcripcionalmente inactivas (Malone et al., 2016).

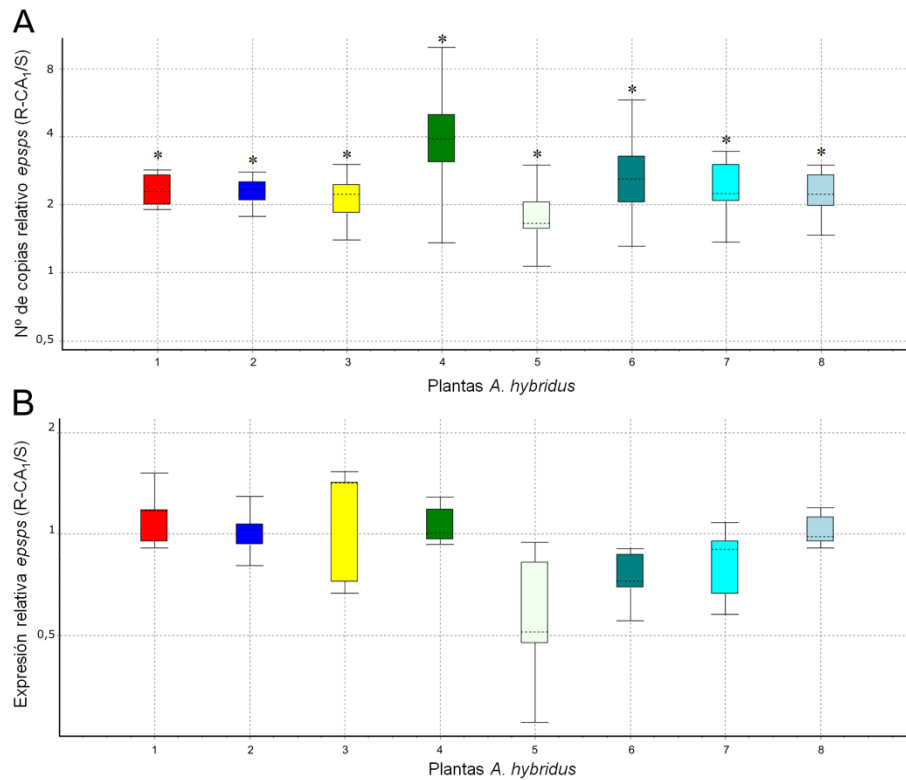


Figura 16. Estudio del mecanismo de amplificación del gen *epsps*. El número relativo de copias del gen *epsps* (A) y los niveles de expresión relativa al gen *als* (B) fueron determinados por PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando las determinaciones de las muestras S-HU como referencia. Las barras verticales representan el error estándar de la media. * Indica diferencias estadísticamente significativas.

Es importante resaltar que los dos mecanismos asociados al sitio de acción actuando de manera simultánea fueron sólo reportados recientemente para *Eleusine indica* (Gherekhloo et al., 2017). De esta manera, este sería el segundo reporte en el cual mutaciones puntuales y amplificación del gen *epsps* están evolucionando juntas en una misma población. Basados en los resultados, se plantea la hipótesis de que la amplificación del gen *epsps* es un mecanismo emergente en la población R-CA (dado el bajo número de copias del gen) y que, por lo tanto, su efecto en los niveles de expresión del gen podría no ser detectable aún.

3.3.2.5 Frecuencia de la sustitución TAP-IVS en la población R-CA

Basados en la información de secuencia, se diseñó un experimento para determinar la frecuencia de aparición del alelo portador de la triple mutación (alelo R) en la población R-CA original. Para ello, se utilizaron las técnicas de dCAPS, HRMA y/o secuenciación (como se describió en la sección 3.2.2.9) para genotipar 130 semillas. Los perfiles obtenidos mediante HRMA se observan en la Figura 17C. Los cromatogramas parciales derivados de la secuenciación se muestran en la Figura 18.

Este ensayo reveló que al menos el 48% de las muestras eran homocigotas para el alelo R (representado como genotipo RR); y el 52% restante fueron clasificadas como portadoras del alelo wt (representadas como genotipo RS) (Figura 18). Estos resultados resultan un tanto difíciles de interpretar, ya que si el alelo wt está presente en algunas plantas y *A. hybridus* es una especie esencialmente autógama hubiera sido de esperar, en condiciones de herencia mendeliana, la aparición de plantas homocigotas para el alelo wt, como ocurrió con el alelo R. En el único contexto en que podría explicarse este resultado es en una situación en la cual el mecanismo de amplificación génica esté presente en la población R-CA. Así, aquellas plantas clasificadas bajo el genotipo RS podrían ser, en realidad, homocigotas para el alelo R y portadoras de amplificación génica, por lo cual un alelo S podría estar presente en otro locus. Adicionalmente, dada la posible ocurrencia de una amplificación en el gen *epsps*, no se puede descartar *a priori* la presencia de los alelos IAS, TVS y TAS (simples y dobles sustituciones) en las muestras clasificadas bajo el genotipo RS, aunque en este caso las mismas deberían ocurrir en una combinación tal que los cromatogramas de las secuencias sean indistinguibles de los heterocigotas TAP/IVS (Figura 18, cromatograma inferior). Como no se detectó

ninguna mutante homocigota para estos genotipos, se propone que sólo dos versiones alélicas (R: IVS, S: TAP) están presentes en la población R-CA.

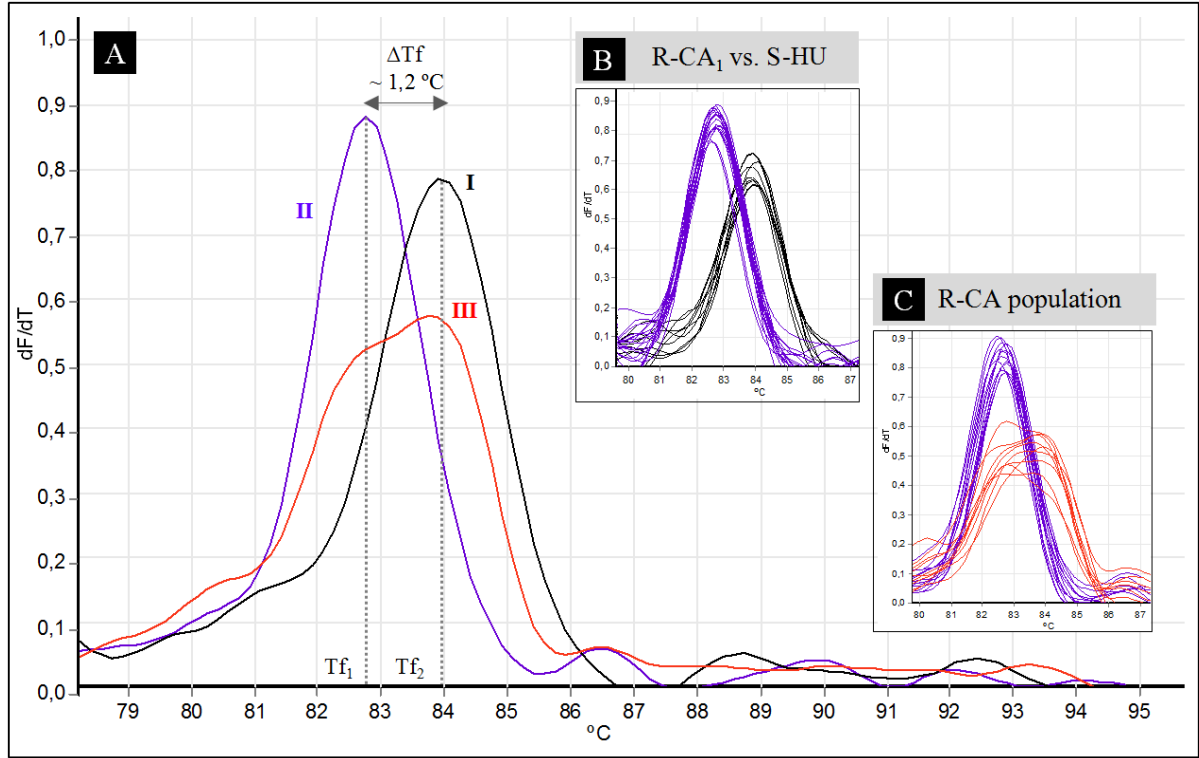


Figura 17. Análisis de alta resolución de las curvas de fusión para la detección de la triple sustitución TAP-IVS en la EPSPS. A) Perfiles representativos de curvas de fusión para homocigotas TAP (I, línea negra), homocigotas IVS (II, línea violeta), y heterocigotas artificiales (III, línea roja). La triple sustitución causa un corrimiento de $\sim 1,2^\circ\text{C}$ en la temperatura de fusión del fragmento amplificado del gen *epsps*. B) Curvas de fusión para las plantas R-CA₁ (líneas violetas) y para las plantas S-HU (líneas negras) mostrando todos genotipos IVS homocigotas y TAP homocigotas, respectivamente. C) Curvas de fusión para la población R-CA original, donde el alelo wt estuvo presente en algunas muestras (líneas rojas) y no en otras (líneas violetas).

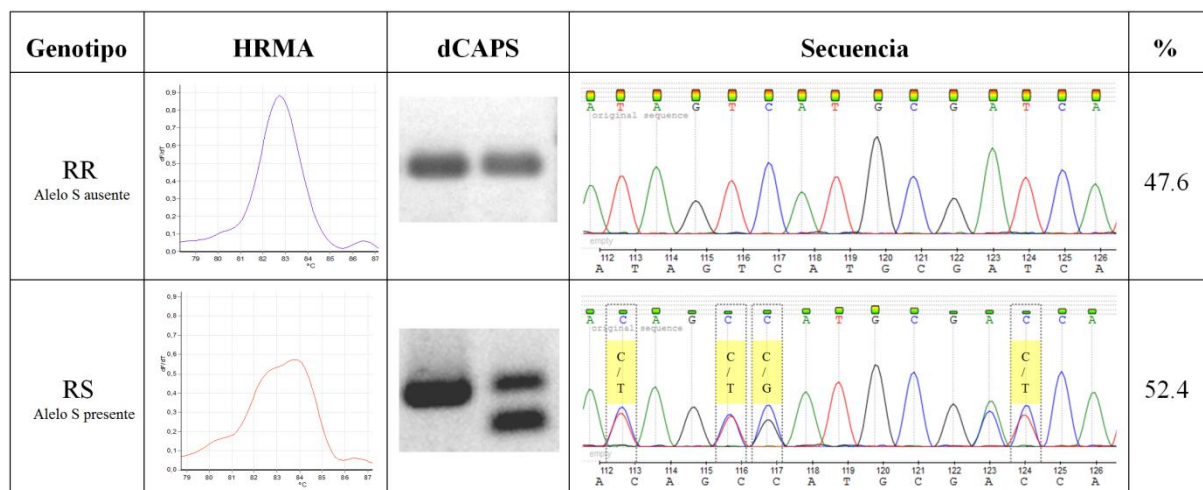


Figura 18. Pasos para la clasificación genotípica de las muestras de la población R-CA. “R” da cuenta del alelo mutante IVS mientras que “S” da cuenta del alelo salvaje (wt). Un único pico (HRMA), ausencia de digestión (dCAPS) y/o una asignación inequívoca de nucleótidos en la región de la triple sustitución fueron observadas para las muestras IVS homocigotas (línea RR). Los picos dobles (HRMA), la digestión parcial (dCAPS) y/o la asignación ambigua de nucleótidos causantes de la triple mutación (líneas punteadas) se observan en las muestras IVS heterocigotas (línea RS). †El enfoque diploide abordado aquí podría ser una sobresimplificación de los genotipos reales, ya que puede existir amplificación del gen *epsps*. La presencia de los alelos IAS, TAS y TVS fue despreciada basada en la ausencia de muestras homocigotas para estos genotipos.

El alto porcentaje de individuos resistentes que resultaron homocigotas para la triple sustitución TAP-IVS (RR) parecería sugerir que la sustitución nueva A103V no es un evento reciente. Por otro lado, la ausencia de individuos homocigotas para la mutación P106S podría ser atribuida a los bajos niveles de resistencia aportados por la misma. Adicionalmente, la no detección de individuos homocigotas para la doble sustitución TIPS podría relacionarse al elevado costo que ha sido asociado a la misma (Funke et al., 2009; Han et al., 2017). En cualquiera de los casos, debería existir alguna ventaja adaptativa de las mutantes TAP-IVS por sobre la doble mutante que pueda explicar la prevalencia del alelo R en la población R-CA. Esta ventaja podría ser que: 1) Las mutantes TAP-IVS conlleven un costo menor o muy pequeño y por lo tanto proliferaron selectivamente, y/o 2) Las mutantes TAP-IVS podrían conferir mayores niveles de resistencia a glifosato y mayor tolerancia a aplicaciones repetidas. Considerando la historia del campo donde esta población fue cosechada y el GR₅₀ determinado para esta población, el segundo escenario parece ser el más probable. De cualquier manera, un costo en la aptitud de esta población asociado a la triple sustitución no puede ser descartado.

La combinación de mecanismos de resistencia a glifosato usualmente conlleva un efecto aditivo en la magnitud de la resistencia. Sin embargo, como no fue posible encontrar ningún individuo homocigota wt (genotipo SS), no hay evidencia para pensar en la presencia de mecanismos no asociados al sitio de acción contribuyendo al elevado factor de resistencia estimado para la población R-CA.

Por otro lado, se decidió evaluar si las plantas R-CA₁ (que fueron caracterizadas como RR, Figura 17B) podían tolerar la dosis más elevada aplicada de glifosato utilizada en las curvas de dosis-respuesta. Los resultados observados fueron contundentes: todas las plantas R-CA₁ sobrevivieron a la aplicación de la dosis 32X, produciendo descendencia viable. Esta observación, junto al registro de un desarrollo aparentemente normal de las plantas en ausencia de glifosato (datos nos mostrados), apoyarían la hipótesis de que no existe un costo en la aptitud de la población asociado a este genotipo. De todas maneras, estudios rigurosos son necesarios para validar fielmente esta presunción.

Finalmente, cuando los parámetros de la curva de dosis-respuesta son comparados con los de todas las especies resistentes a glifosato caracterizadas a nivel molecular en el mundo (Tabla 11), el valor de GR₅₀ de la población R-CA resulta, por lejos, el más elevado de todos los reportados, con mención especial a una población de *E. indica* que presenta un valor de DL₅₀ similarmente elevado (Yu et al., 2015). Esta población contenía la sustitución TIPS como único mecanismo de resistencia a glifosato. A pesar de que *E. indica* y *A. hybridus* sean diferentes especies, la única diferencia entre los mecanismos de resistencia a glifosato encontrados entre estas dos poblaciones remite a la tercera sustitución A103V, reforzando la hipótesis de la contribución de la misma a los altos niveles de resistencia observados.

Tabla 11. Valores de GR₅₀ (inhibición del crecimiento media) y/o DL₅₀ (dosis letal media) para las especies de malezas resistentes a glifosato caracterizadas a nivel molecular hasta el momento.

Especie	GR ₅₀ [†]	DL ₅₀ [†]	Mecanismo	Ref.
<i>Amaranthus palmeri</i>	560		Amplificación génica	Gaines et al., 2010; Culpepper et al., 2006
<i>Amaranthus rudis</i>	2984		Amplificación génica	Sarangi et al., 2015; Sarangi et al., 2017
<i>Amaranthus spinosus</i>	700		Amplificación génica	Nandula et al., 2014
<i>Amaranthus tuberculatus</i>	1280		P106S + Translocación reducida	Nandula et al., 2013
<i>Ambrosia trifida</i>	1300		Rápida muerte celular (mecanismo “fénix”)	Van Horn et al., 2018
<i>Bidens pilosa</i>	142,7	774,4	Translocación reducida	Alcántara-de la Cruz et al., 2016a
<i>Bidens pilosa</i>	1055,8	>2000	TIPS + Translocación reducida	Alcántara-de la Cruz et al., 2016a
<i>Bromus diandrus</i>		288	Amplificación génica	Malone et al., 2016
<i>Chloris truncata</i>		5514	Amplificación génica	Ngo et al., 2018
<i>Conyza canadensis</i>	311,2		Translocación reducida + Metabolismo acelerado	Gonzalez-Torralva et al., 2012b
<i>Conyza canadensis</i>	>3600		P106S	Page et al., 2018
<i>Conyza canadensis</i>	1740		Sobreexpresión de la EPSPS	Mei et al., 2018
<i>Echinochloa colona</i>	890		P106S	Alarcón-Reverte et al., 2013
<i>Echinochloa colona</i>	240	1010	P106T + Actividad EPSPS aumentada	Alarcón-Reverte et al., 2015
<i>Echinochloa colona</i>	130	450	P106S + Actividad EPSPS aumentada	Alarcón-Reverte et al., 2015
<i>Eleusine indica</i>	173	798	P106S	Yu et al., 2015
<i>Eleusine indica</i>	1383,7		P106L	Chen et al., 2015
<i>Eleusine indica</i>	555,6	1938,3	P106S + Sobreexpresión de la EPSPS	Gherekhloo et al., 2017
<i>Eleusine indica</i>	1551,5		TIPS	Chen et al., 2015
<i>Eleusine indica</i>	2023	>25900	TIPS	Yu et al., 2015
<i>Kochia scoparia</i>		6100	Amplificación génica	Wiersma et al., 2015
<i>Leptochloa virgata</i>	719,8	1330,3	P106S + Translocación reducida + Actividad EPSPS aumentada	Alcántara-de la Cruz et al., 2016b
<i>Lolium perenne</i>	1596		Amplificación génica	Salas et al., 2012
<i>L. perenne</i> spp. <i>multiflorum</i>	1782		P106A	Jasieniuk et al., 2008
<i>L. perenne</i> spp. <i>multiflorum</i>	300		P106S + Translocación reducida	Perez-Jones et al., 2008
<i>Lolium rigidum</i>	2554	6983	P106L/S	Collavo et al., 2012
<i>Lolium rigidum</i>		2310	P106A + Translocación reducida	Yu et al., 2007
<i>Lolium rigidum</i>	1330	2251	P106T/S + Translocación reducida	Bostamam et al., 2012
<i>Lolium rigidum</i>		714	P106T + Translocación reducida	Wakelin y Preston, 2006
<i>Sorghum halepense</i>		2182	Translocación reducida	Vila-Aiub et al., 2007 y Vila-Aiub et al., 2012
<i>Tridax procumbens</i>	554,31	916,27	T102S	Li et al., 2018

[†] En los casos en los que más de 1 población fue estudiada, se muestra el valor de GR₅₀ o DL₅₀ más elevado.

3.3.2.6 Modelado estructural de la versión TAP-IVS de la EPSPS

En trabajos previos, la versión TIPS de *E. coli* fue cristalizada y el efecto de esta doble mutación en la funcionalidad de la enzima y la resistencia a glifosato fue estudiado en detalle

(Funke et al., 2009). Este análisis mostró que la sustitución T97I (T102I en plantas) en presencia de la S101 (S106 en plantas) produce un cambio de orientación de la G96 (G101 en plantas) hacia el sitio de unión al glifosato, causando una reducción de la afinidad de la enzima EPSPS por el herbicida, al mismo tiempo que la afinidad por el PEP (uno de sus sustratos) también se reduce. Como consecuencia, se producen niveles de resistencia a glifosato más elevados a expensas de una menor eficiencia catalítica de la enzima, lo que finalmente se traduce en un costo en la aptitud de las plantas que expresan esta versión doblemente mutada, como ya ha sido descrito para una población de *E. indica* (Han et al., 2017).

Como no existe hasta el momento una estructura cristalizada de la EPSPS en *A. hybridus*, se realizó un modelado por homología sobre las versiones wt, TIPS y TAP-IVS de la EPSPS utilizando los moldes de *E. coli* y la secuencia completa disponible para el ADNc de *A. hybridus* (patente US20130288895A1). Los moldes fueron seleccionados debido a una alta identidad con las secuencias de interés (~54%) y a la posibilidad de utilizar estructuras cristalinas con buena resolución tanto en presencia de glifosato como de shikimate-3-P (Figura 19A).

Con el objetivo de analizar las modificaciones estructurales producidas por la triple sustitución TAP-IVS sobre el sitio de unión al glifosato, se comparó la distancia entre el glifosato y el residuo de G101 (equivalente a G96 en *E. coli*), como fue previamente descrito para la mutante TIPS. Los resultados indican que la sustitución adicional en la posición 103 produce un leve cerramiento del sitio de unión al PEP y al glifosato respecto a la versión TIPS, lo cual es evidenciado por un acortamiento en la distancia entre el glifosato y este residuo clave de glicina (Figura 19B). Como puede observarse, esta distancia se reduce de 3,6 Å (línea roja discontinua) a 3,3 (línea celeste discontinua) y 3,2 (línea rosada discontinua) en las versiones TIPS y TAP-IVS, respectivamente. En relación a esto, el análisis adicional a través de la aplicación LIDIA del programa COOT permitió detectar que existe un re-arreglo de los aminoácidos involucrados en la interacción con el glifosato, que se evidencia por el cambio de identidad de aquellos que forman parte de las esferas de coordinación primarias y secundarias con dicho ligando (Figura 19C). Sin embargo, los ocho aminoácidos esenciales para la unión del PEP (Schönbrunn et al., 2001; Pollegioni et al., 2011), siguen presentes en todas las versiones. Curiosamente, cuando se compararon los modelos TIPS y TAP-IVS, la

arginina en la posición 131 (equivalente a la 124 en *E. coli*) sólo mantiene una de sus dos posibles interacciones con el glifosato en el caso de la triple mutante.

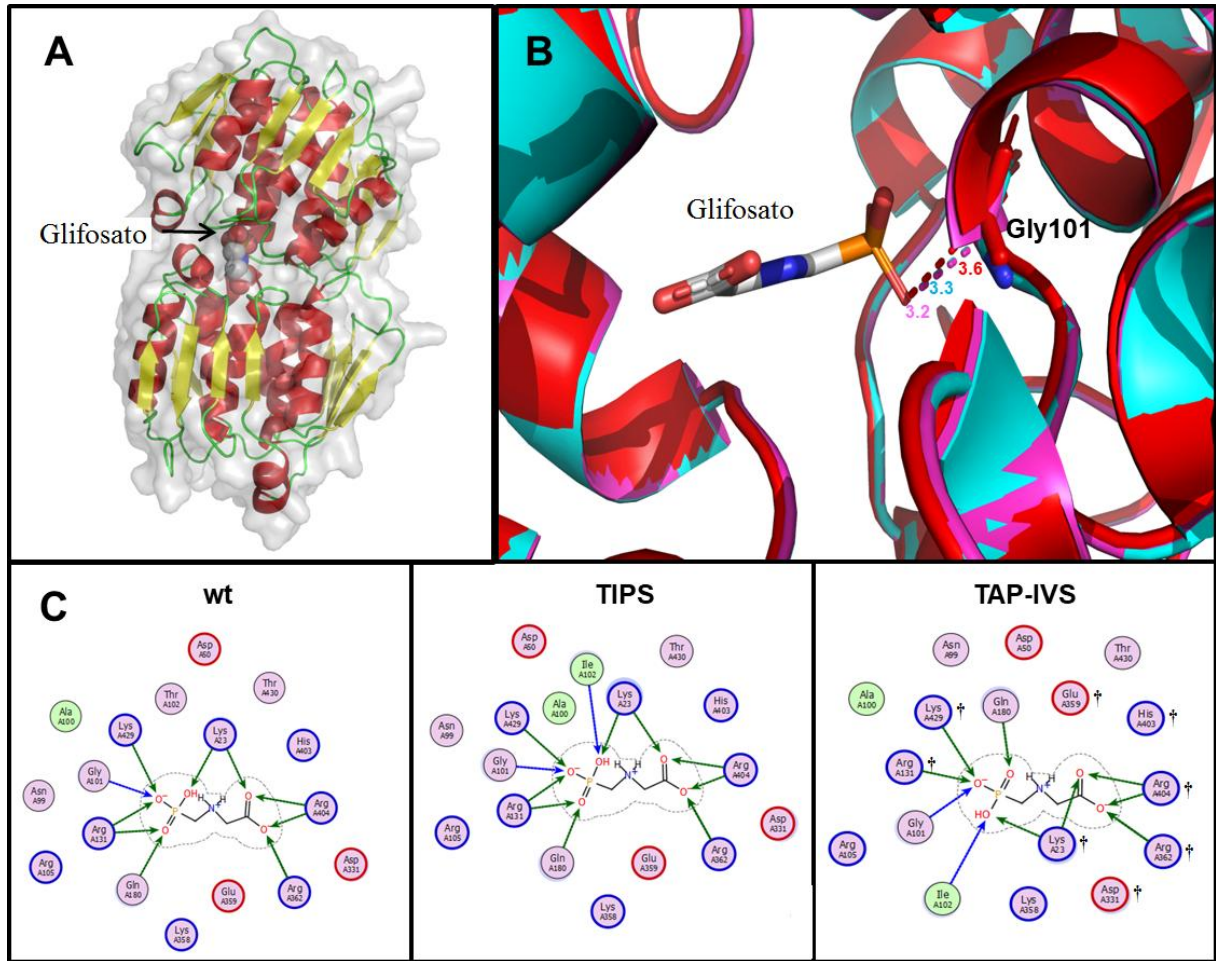


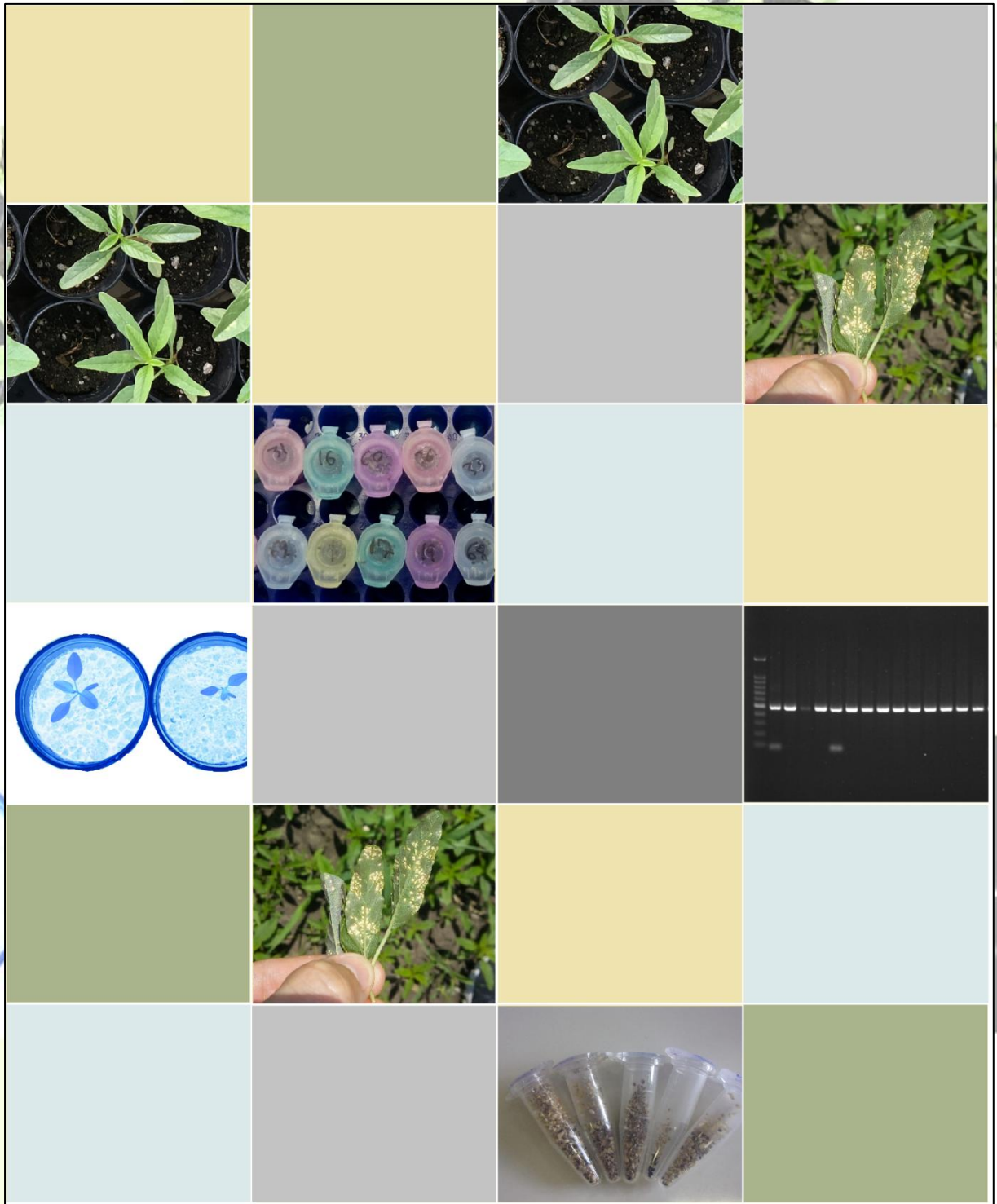
Figura 19. Modelado estructural de las variantes EPSPS wt, TIPS y TAP-IVS. A) Modelado estructural por homología utilizando la EPSPS wt de *E. coli* (1G6S pdb) como molde en el servidor Swiss-Prot. B) Distancia de interacción entre el glifosato y el residuo G101 en la wt (línea roja discontinua), TIPS (línea celeste discontinua) y TAP-IVS (línea rosada discontinua). C) Residuos involucrados en la unión del PEP/glifosato en las versiones wt, TIPS y TAP-IVS. Los residuos básicos están coloreados en azul, los ácidos en rojo, los apolares en verde y los polares en rosa. Las flechas azul y verde indican los dadores y aceptores de cadena lateral, respectivamente. † En el esquema de TAP-IVS se indican los ocho aminoácidos esenciales para la unión del PEP.

Finalmente, estos resultados permiten formular la hipótesis de que la estructura conformacional de la versión TAP-IVS poseería un sitio activo más pequeño, lo cual causaría una exclusión diferencial del glifosato que podría ser superada por el PEP debido a su menor tamaño molecular.

3.4 CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este capítulo resultaron muy novedosos. Por un lado, representan el primer informe oficial sobre los mecanismos moleculares causantes de resistencia cruzada a inhibidores ALS en la especie de maleza más problemática de Argentina. Luego de más de 17 años de detectadas las poblaciones locales de *A. hybridus* con resistencia a inhibidores de la ALS, se reporta la presencia de las sustituciones W574L y D376E en la ALS de las mismas como mecanismo causante de una resistencia de amplio espectro. Por otro lado, se informa sobre la prevalencia de una triple sustitución novedosa (TAP-IVS) como el único mecanismo detectado en una población de *A. hybridus* portadora de valores inusualmente elevados de RG. Estos resultados sugieren la evolución de un nuevo mecanismo de RG apareciendo en *A. hybridus* y representan: 1) el primer reporte de una triple sustitución en la enzima EPSPS y 2) el primer mecanismo de resistencia asociado al sitio de acción descrito en esta especie a nivel mundial.

Estos resultados, además de confirmar la hipótesis de trabajo planteada en la sección 3.1, deben alertar sobre la necesidad de integrar nuevas estrategias de control químico con prácticas no químicas en los programas de manejo para disminuir la evolución de la resistencia a herbicidas en Argentina y prevenir tanto la emergencia de nuevos mecanismos de resistencia como la acumulación de los ya existentes.



CAPÍTULO 3



Los resultados descriptos a continuación fueron producto de una estadía de investigación en el laboratorio de *Weed Molecular Biology and Genomics* del Dpto. de *Crop Sciences*, en la Universidad de Illinois, Urbana-Champaign, Estados Unidos. Mis agradecimientos para todos los miembros del laboratorio, para la comisión Fulbright y para el Ministerio de Educación y Deportes de la Nación, por haber brindado los medios necesarios para el desarrollo de esta investigación. En especial, quiero agradecer al Dr. Patrick J. Tranel y al Mg. Brent P. Murphy, coautores del trabajo publicado producto de estos avances científicos.

Publicación de referencia

Murphy BP¹, **Larran AS¹**, Ackley B, Loux M, Tranel PJ **(2018)** Survey of Glyphosate-, Atrazine- and Lactofen-Resistance Mechanisms in Ohio Waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) populations. *Weed Science*. Aceptado. En prensa. Artículo WS-D-18-00115R2.

CAPÍTULO 3

PREVALENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA A GLIFOSATO, LACTOFEN Y ATRAZINA EN 22 POBLACIONES DE *Amaranthus tuberculatus* DEL ESTADO DE OHIO, ESTADOS UNIDOS.

4.1 INTRODUCCIÓN

Como ya se ha mencionado en los capítulos 1 y 2, la resistencia a herbicidas representa un gran problema en los sistemas agropecuarios de todo el mundo y los Estados Unidos no son la excepción. *Amaranthus tuberculatus* Moq. Sauer es la especie de maleza más problemática en los cultivos agronómicos de los estados de Illinois, Iowa y Missouri (Chatham et al., 2015; Legleiter y Bradley, 2008; McMullan y Green, 2011; Schultz et al., 2015), causando pérdidas en el rendimiento de hasta un 43% en cultivos de soja (Hager, 2002) y de hasta un 74% en cultivos de maíz (Steckel y Sprague, 2004).

A. tuberculatus posee un largo período de germinación, una rápida tasa de crecimiento, una alta densidad poblacional y una abundante producción de semillas (Tranel y Trucco, 2009). Al igual que *A. palmeri*, es una especie dioica y la polinización cruzada obligada facilita un rápido enriquecimiento y recombinación de alelos asociados a los sitios de acción de los herbicidas (Busi y Powles, 2009). Así, desde el primer reporte de resistencia a herbicidas inhibidores del PSII a comienzos de los años 90' (Anderson et al., 1996), la evolución de la resistencia se apoderó rápidamente de otros sitios de acción incluyendo la ALS, PPO, EPSPS, HPPD y receptores de auxinas.

Al día de hoy se han reportado casos de resistencia múltiple a dos, tres, cuatro e inclusive cinco sitios de acción diferentes en la misma población de *A. tuberculatus* (Foes et al. 1998, Legleiter y Bradley, 2008, Bell et al., 2013, Heap, 2019). Actualmente, existen 56 casos reportados de poblaciones de *A. tuberculatus* con RH en 18 estados de EEUU (Heap, 2019). Mientras que algunos fenotipos de resistencia están especialmente localizados en ciertas regiones geográficas, otros se han expandido a lo largo de grandes regiones, como ha ocurrido con la resistencia a glifosato en todo el centro-oeste de Estados Unidos (Chatham et al., 2015; Schultz et al., 2015; Vieira et al., 2018).

Los científicos de las malezas, y lentamente los productores, están convencidos acerca de la urgente necesidad de diversificar las prácticas de control que se incluyen dentro de los programas de manejo de malezas (Norsworthy et al., 2012; Pannell et al., 2016), pero se necesitan herramientas que permitan aconsejar a los productores en el lapso en el que se genera conciencia acerca de cuáles son las mejores prácticas de manejo para la situación actual. La conducción de encuestas y censos resulta muy útil en la creación de mapas, tanto de distribución de especies como de mecanismos de resistencia, tomando vital importancia para un diseño preciso y responsable de estrategias de control de malezas geolocalizadas o geodirigidas.

Actualmente, sólo existen dos reportes de resistencia a herbicidas en poblaciones de *A. tuberculatus* del estado de Ohio: un caso de resistencia a inhibidores de la ALS y un caso de resistencia a glifosato, ambos en cultivos de soja (Heap, 2019). Sin embargo, los mecanismos de resistencia en estas poblaciones no fueron dilucidados. En este contexto, resulta pertinente generar información que permita prevenir que esta especie se vuelva tan problemática en este Estado como ya lo es en otros.

Dado que *A. palmeri* fue identificada por primera vez en Argentina hace 6 años, posiblemente introducida desde Estados Unidos (Morichetti et al., 2013), resulta clave profundizar sobre los estudios de la resistencia en varias especies de malezas de este género que representan un problema grave en los sistemas de producción agrícola, independientemente de su origen. Consecutivamente, es relevante indagar sobre los mecanismos de resistencia a herbicidas que se estén utilizando actualmente como alternativas al glifosato y a los inhibidores ALS, pero para los cuales no haya casos de resistencia reportados en Argentina (como lo es el caso de los inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa -PPO- y la atrazina, inhibidor el PSII).

En el marco de un proyecto colaborativo, se propuso caracterizar la resistencia a herbicidas pertenecientes a tres grupos diferentes en la especie *Amaranthus tuberculatus*, una especie “driver” de características reproductivas muy similares a *A. palmeri*. Particularmente, se estudió la prevalencia de la resistencia en 22 poblaciones colectadas durante el año 2016, así como también la frecuencia de cada uno de los mecanismos de RT más reportados para especies del género en otros estados.

Objetivos

(1) Determinar la prevalencia y distribución de los mecanismos moleculares causantes de resistencia a glifosato, atrazina y lactofen en 22 poblaciones de *Amaranthus tuberculatus* del estado de Ohio.

(2) Generar un capital académico que permita el estudio y rápida detección de mecanismos de resistencia plausibles de emerger en el futuro en los sistemas de producción de Argentina.

Hipótesis de trabajo

Las tasas de resistencia a glifosato, atrazina y lactofen han alcanzado niveles mensurables en las poblaciones de *Amaranthus tuberculatus* distribuidas en el estado de Ohio.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Recolección del material vegetal y condiciones de crecimiento

Las semillas de la especie *A. tuberculatus* fueron recolectadas durante una encuesta de finales de temporada de 2016 en el estado de Ohio, Estados Unidos. El muestreo se limitó a campos de soja con patrones de infestación indicativos de posibles problemas de resistencia a herbicidas. Las muestras de semillas, provenientes de diez plantas creciendo dentro de áreas pequeñas, fueron combinadas para armar una muestra que reflejase la población presente dentro del campo muestreado.

Las semillas de 22 poblaciones de *A. tuberculatus* de Ohio y de una población sensible conocida, llamada WUS (Wu et al., 2018), fueron esterilizadas superficialmente y conservadas a 4 °C durante cinco semanas antes de ser sembradas. La esterilización superficial consistió en una incubación de dos minutos en etanol al 70% v/v, seguida de una incubación de 20 minutos en una solución de lavandina comercial y agua destilada 1:1, cuatro lavados con agua destilada y una resuspensión final en agarosa al 0,1%. Las semillas se germinaron en placas de Petri estériles que contenían papel de filtro saturado con agua, y se incubaron a 35 °C con un ciclo de 12:12 hs día:noche. Las plántulas se trasplantaron a recipientes individuales (3,8 cm de diámetro superior por 21 cm de profundidad; Stuewe and Sons Inc., 31933 Rolland Dr, Tangen, OR 97389) conteniendo una mezcla 3:1:1:1 de sustrato sunshine LC1:tierra:perlita:arena. Las plantas se cultivaron en invernadero bajo un fotoperíodo de 12 h a temperaturas que oscilaron entre 28 y 30 °C durante el día y entre 25 y 27 °C durante la noche. Las plantas fueron regadas dos veces al día con riego por nebulización.

4.2.2 Tratamientos con herbicidas

Una vez que las plantas alcanzaron el estadio de 4-6 hojas, se seleccionaron hasta 20 plantas relativamente uniformes en crecimiento de cada población para el tratamiento con cada herbicida. Los tratamientos con herbicidas incluyeron lo siguiente: Roundup WeatherMax (sal potásica de glifosato 48,8 % p/p) a 840 g i.a./ha y 1260 g i.a./ha (1X y 1,5X la tasa recomendada, respectivamente), Atrazine 90DF (atrazina 88 % p/p) a 1284 g i.a./ha

(1X) y Cobra (lactofen 24% p/v) a 5,48 g i.a./ha (0,03X). Los adyuvantes se incluyeron en base a las especificaciones de las etiquetas de cada herbicida. Las plantas de la población de WUS se usaron como controles susceptibles, y grupos de plantas no aplicadas se incluyeron como controles no tratados. Los herbicidas se aplicaron utilizando una cámara de pulverización equipada con una boquilla plana 80015 (TeeJet Technologies, P.O. Box 7900, Wheaton, IL 60187) colocada a una distancia aproximada de 46 cm por encima de las plantas. La cámara de pulverización se calibró para suministrar 187 L/ha. La supervivencia de cada planta se evaluó tres semanas después del tratamiento con glifosato y dos semanas después del tratamiento con lactofen o atrazina. Las plantas fueron clasificadas como resistentes o susceptibles según la presencia o ausencia de nuevo tejido verde. El éxito de la germinación y la uniformidad en el desarrollo de las plántulas, permitieron examinar un total de 22, 13 y 16 poblaciones para estudiar la resistencia a lactofen, atrazina y glifosato, respectivamente.

4.2.3 Extracciones de ADN

Se utilizaron hojas individuales de todas las plantas resistentes y varias plantas WUS no tratadas para obtener ADN. El mismo se extrajo utilizando el método del bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), como ha sido descrito por Doyle y Doyle (1990). Las muestras se evaluaron en lo referente a calidad y cantidad del ADN utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Las muestras fueron diluidas para lograr una concentración uniforme de 10 ng/μL para los diagnósticos moleculares.

4.2.4 Estudio de los mecanismos moleculares de la resistencia

4.2.4.1 Amplificación en el gen *epsps*

Se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) utilizando el ADN de las plantas sobrevivientes a las aplicaciones de glifosato con el objetivo de determinar el número de copias del gen *epsps*. Se utilizó como referencia un gen de copia única (*cps*, que codifica la subunidad grande de la carbamoilfosfato sintasa). El protocolo de amplificación ha sido descrito previamente (Délye et al., 2015; Ma et al., 2013). Las cuantificaciones comparativas de los valores Ct (método $\Delta\Delta Ct$) fueron hechas con el software REST (Pfaffl et al., 2002).

4.2.4.2 Sustituciones en la P106 de la EPSPS

El ADN de las plantas sobrevivientes a la aplicación de glifosato se utilizó para detectar la prevalencia de sustituciones en la prolina 106 en cada población de *A. tuberculatus*. Específicamente, se llevó a cabo un ensayo denominado dCAPS (como se describe en 2.2.4.1) que permite diferenciar el alelo salvaje de aquellos mutantes en el codón de la P106. La PCR y la posterior digestión con la enzima de restricción NcoI se realizaron como se describió previamente (Chatham et al., 2015). Los fragmentos de ADN se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con GreenGlo Safe DNA Dye (Denville Scientific Inc). Las muestras de ADN de la población control se incluyeron para validar la fidelidad de la prueba. Las plantas que presentaron la banda no digerida se clasificaron como portadoras de una sustitución en la prolina 106. Posteriormente, se realizó la secuenciación del ADN de los sobrevivientes a glifosato para confirmar la fidelidad del test e identificar la sustitución específica de la P106. La amplificación de ADN de la región P106 se realizó utilizando procedimientos similares a los descritos por Nandula et al. (2013). En resumen, los productos de PCR se purificaron utilizando el kit de EZNA (Omega Bio-tek). Los productos purificados se sometieron a la secuenciación de Sanger utilizando un Kit BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific). Las reacciones consistieron en 1 µL de mezcla BigDye, 2 µL de buffer de secuenciación 5x, 5,2 µL de glicerol al 12,5% v/v, 2 µL del oligonucleótido R98-F (5'-CTTGGGATACGTGAGAAGCAACAGTTG-3'), 1 µL de ADN molde y 1,8 µL de agua destilada para alcanzar un volumen final de 13 µL por reacción. Los tubos se sometieron a una desnaturalización inicial a 96 °C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos a 96 °C durante 10 segundos, 50 °C durante 5 segundos y 60 °C durante 4 minutos, y una extensión final de 60 °C durante 5 minutos. Los productos de PCR fueron secuenciados por el Centro de Secuenciación Core de la Universidad de Illinois (Urbana, Illinois, EE. UU.).

4.2.4.3 Deleción de la G210 del gen de la PPO

Se realizó un ensayo de qPCR con sondas TaqMan sobre el ADN de las plantas sobrevivientes a la aplicación de lactofen, junto con cuatro controles WUS, con el fin de determinar la presencia de plantas homocigotas o heterocigotas para el alelo *ppo* con una deleción de la glicina en la posición 210 (Δ G210). El diseño experimental y las sondas alelo-

específicas utilizadas fueron previamente descritas (Wuerffel et al., 2015). Los oligonucleótidos utilizados fueron descritos por Giacomini et al. (2017).

4.2.4.4 Sustitución de la R98 de la PPO

Una región de 500 pb del gen de la PPO de las plantas sobrevivientes a lactofen se secuenció según Giacomini et al. (2017), con algunas modificaciones. En la PCR inicial, el cebador directo fue southernF (5'-TCCATTACCCACCTTTCACC-3') y el cebador reverso fue southernR (5'-AGCGGGATTTGAAGGTAGTAG-3'). En la segunda PCR, el cebador reverso fue R98M_XhoII (5'-AGCGGGATTTGAAGGTAGTAG-3'). Los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con GreenGlo Safe DNA Dye y luego se purificaron con el Kit EZNA Gel Extraction siguiendo el protocolo del fabricante. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo tal como se describe en la sección 4.2.4.2.

4.2.4.5 Sustitución de la S264 de la proteína D1

Las plantas sobrevivientes a la aplicación de atrazina fueron utilizadas para la búsqueda de sustituciones en la serina 264 en la proteína D1 del fotosistema II. Las muestras de ADN se sometieron a un ensayo “CAPS” (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) en el que solo el alelo de tipo salvaje del gen se escinde mediante un corte de la enzima de restricción BfaI. La diferencia entre los ensayos CAPS y dCAPS radica en que, en el primero, el sitio de corte para una enzima de restricción existe naturalmente en la secuencia blanco y no es necesario introducirlo artificialmente con un oligonucleótido especialmente diseñado para ello. La amplificación del fragmento, su digestión y el análisis de los resultados se llevaron a cabo como se describe en Schultz et al. (2015).

4.2.4.6 Mapas de distribución

Se utilizó el programa web PhyloGeoVis (phylogeoviz.org) para generar archivos kml basados en los datos de geo-localización de las muestras colectadas. Las proporciones de plantas resistentes y la frecuencia de aparición de los mecanismos estudiados en cada

población, fueron representadas a través de pequeños gráficos de torta insertados en un mapa del estado de Ohio adquirido de Google Maps.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Resistencia a glifosato

La resistencia a glifosato estuvo presente en todas las muestras analizadas del estado de Ohio (Tabla 12, Figura 20). Esporádicamente, se observó la supervivencia de plantas de la población control WUS a la dosis 1X, por lo cual se re-aplicaron un subgrupo de poblaciones con una dosis 1,5X. Esta dosis sí resultó letal para la población WUS y las tasas de supervivencia de las poblaciones resistentes fueron similares para ambas aplicaciones. El fenómeno observado podría deberse a escapes, o bien a plantas de la población control que realmente poseen resistencia a glifosato. Previamente, un grupo de investigadores reportó un rango de respuestas a glifosato donde ciertas poblaciones poseían una “sensibilidad reducida” a dicho herbicida (Vieira et al., 2018), lo cual podría asociarse a la presencia de genes menores contribuyendo a la resistencia (Busi y Powles, 2009).

Tabla 12. Localización y supervivencia de las poblaciones de Ohio a lactofen, atrazina y glifosato. Los valores se expresan como el número de plantas sobrevivientes sobre el total de plantas aplicadas. NA: No Aplicada.

Población	Latitud	Longitud	Lactofen	Atrazina	Glifosato
1	40,959	-81,001	0/20	19/20	16/20
2	40,960	-81,003	0/20	NA	NA
3	40,916	-80,926	0/20	NA	NA
4	40,915	-80,713	0/20	NA	NA
10	39,831	-83,772	1/20	NA	11/20
11	39,831	-83,777	0/20	2/20	NA
14	40,305	-84,683	1/40	0/15	16/20
16	40,373	-84,672	0/20	NA	19/20
17	40,424	-84,677	0/20	NA	18/20
18	40,492	-84,689	0/20	1/15	20/20
19	40,610	-84,689	8/20	7/15	18/20
20	40,678	-84,667	0/20	NA	NA
30	40,831	-81,887	0/20	3/15	12/20
31	40,831	-81,887	0/20	5/15	18/20
33	40,831	-81,887	12/20	4/15	6/20
35	40,678	-83,862	0/20	3/20	15/20
36	40,864	-83,563	0/20	1/15	18/20
55	38,966	-84,087	0/20	NA	NA
60	40,074	-84,707	3/40	0/15	14/20
62	40,352	-84,627	1/20	3/15	7/20
67	40,615	-83,915	1/20	1/15	14/20
69	40,605	-84,299	3/20	NA	10/20

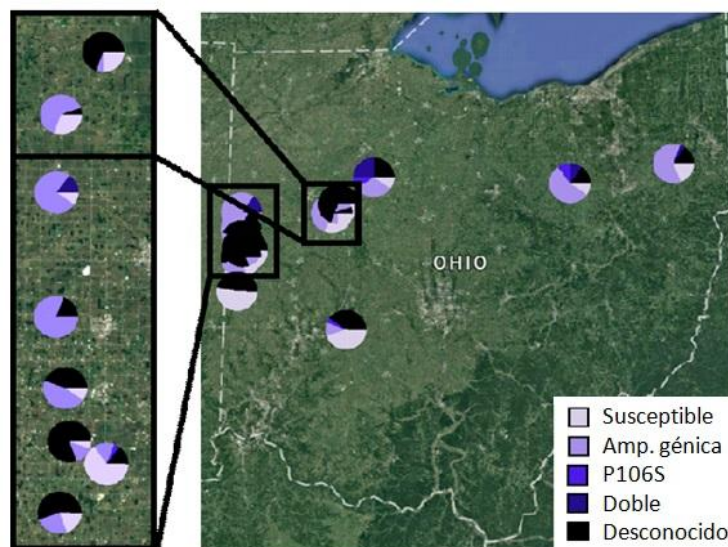


Figura 20. Distribución de los mecanismos de resistencia a glifosato en las poblaciones de *A. tuberculatus* de Ohio.

En lo que respecta a los mecanismos de resistencia a glifosato, la amplificación génica parece ser el mecanismo dominante en las poblaciones de *A. tuberculatus* de Ohio, estando presente en el 49% de todas las plantas sobrevivientes (Tabla 13). Este mecanismo ya fue reportado como forma dominante de la resistencia en los estados de Missouri e Illinois (Chatham et al., 2015; Vieira et al., 2018). Adicionalmente, la frecuencia de la sustitución P106S fue baja (cerca al 6% de las plantas resistentes) si se compara al mecanismo de amplificación génica, lo mismo que se observó en las investigaciones citadas anteriormente. Se observaron múltiples casos de plantas presentando los dos mecanismos estudiados (Tabla 13, columna “Doble”). Esto resulta esperable si ambos mecanismos de resistencia están presentes dentro de una misma población, ya que la recombinación entre ellos debiera ocurrir con cierta frecuencia.

Si bien un 74% de las plantas aplicadas presentó resistencia a glifosato, un gran grupo no presentó ninguno de los mecanismos estudiados (Tabla 13). Esta alta frecuencia de resistencia podría ser el resultado de una extendida aplicación de glifosato al inicio de la temporada, seleccionando así en contra de las plantas susceptibles a dicho herbicida. A su vez, el alto porcentaje de plantas clasificadas con un mecanismo “desconocido” resulta en una evidencia adicional a las ya reportadas para sospechar de, al menos, un tercer mecanismo de

resistencia de bases moleculares que no pudieron dilucidarse hasta el momento (Nandula et al., 2013; Chatham et al., 2015). La prevalencia de plantas resistentes sin un mecanismo de resistencia conocido en Ohio no sólo respalda esta observación, sino que también proporciona evidencia de que este posible tercer mecanismo podría estar tan extendido como otros mecanismos de resistencia.

Tabla 13. Mecanismos de resistencia a glifosato. n° S: número de plantas susceptibles. n° R: número de plantas resistentes. Doble: Amplificación génica y P106S en la misma planta.

Población	n° S	n° R	Amp. génica	P106S	Doble	Desconocido
1	4	16	12	0	1	3
10	9	11	2	1	0	8
14	4	16	5	0	0	11
16	1	19	3	0	0	16
17	2	18	9	0	0	9
18	0	20	16	0	0	4
19	2	18	15	0	3	0
30	8	12	10	1	0	1
31	2	18	15	0	0	3
33	14	6	1	0	2	3
35	5	15	1	0	0	14
36	2	18	6	2	5	5
60	6	14	0	0	0	14
62	13	7	3	1	0	3
67	6	14	13	0	0	1
69	10	10	6	0	0	4

4.3.2 Resistencia a lactofen

A modo general, se observó una baja frecuencia de resistencia a lactofen en 8 de las 22 poblaciones de *A. tuberculatus* estudiadas (Tabla 14, Figura 21). Las 14 poblaciones restantes no presentaron ningún individuo sobreviviente. La mayor parte de la resistencia observada estuvo concentrada en unas pocas poblaciones, indicando que la resistencia a inhibidores de la PPO podría estar geográficamente restringida a una región del estado de Ohio. La identificación de campos con y sin resistencia posibilita, en este sentido, el aislamiento y mantenimiento de alelos susceptibles en toda la región. Dos poblaciones presentaron una frecuencia relativamente alta de resistencia a lactofen. En dichas poblaciones, 19 y 33, la delección $\Delta G210$ se observó en el 35% y el 45% de las plantas tratadas, respectivamente (Tabla 14). La sustitución R98 no se observó en ninguna planta resistente. Se observaron

varios casos de supervivencia de plantas sin ningún mecanismo de resistencia conocido. De hecho, la resistencia en plantas de las poblaciones 14, 60, 62, 67 y 69 no puede explicarse mediante ninguno de los mecanismos conocidos. A raíz de esta observación, se realizó una aplicación adicional de lactofen sobre 20 individuos de las poblaciones 14 y 60 (seleccionadas en base a la disponibilidad de semillas). No hubo sobrevivientes luego de esta segunda aplicación, por lo cual no está claro si las plantas sobrevivientes iniciales fueron verdaderamente resistentes o no se pudieron controlar por otras razones.

Tabla 14. Mecanismos de resistencia a lactofen. n° S: número de plantas susceptibles. n° R: número de plantas resistentes.

Población	n° S	n° R	Δ G210	R98	Desconocido
1	20	0	0	0	0
2	20	0	0	0	0
3	20	0	0	0	0
4	20	0	0	0	0
10	19	1	1	0	0
11	20	0	0	0	0
14	39	1	0	0	1
16	20	0	0	0	0
17	20	0	0	0	0
18	20	0	0	0	0
19	12	8	7	0	1
20	20	0	0	0	0
30	20	0	0	0	0
31	20	0	0	0	0
33	8	12	9	0	3
35	20	0	0	0	0
36	20	0	0	0	0
55	20	0	0	0	0
60	37	3	0	0	3
62	19	1	0	0	1
67	19	1	0	0	1
69	17	3	0	0	3

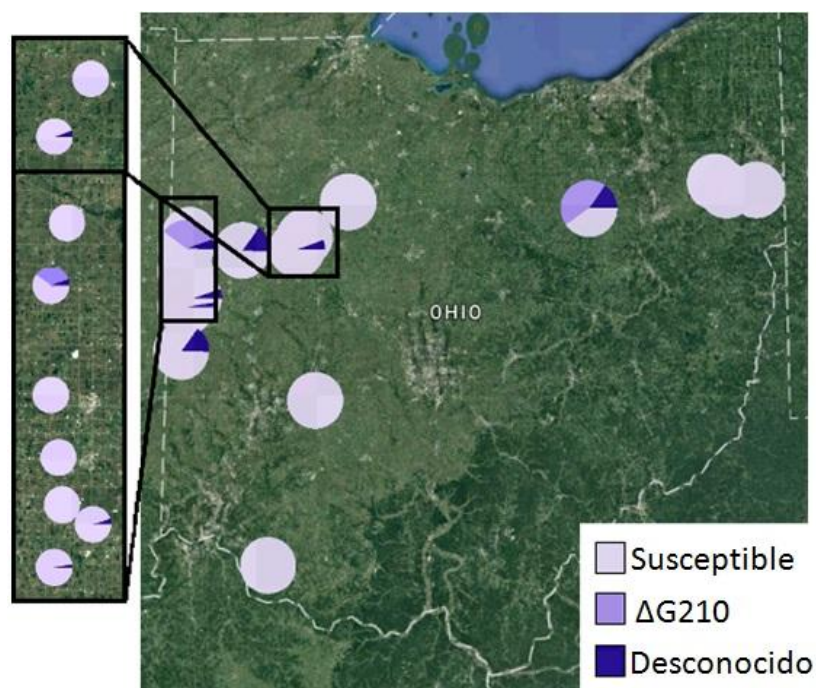


Figura 21. Distribución de la resistencia a lactofen en las poblaciones de *A. tuberculatus* de Ohio. La sustitución R98 no fue detectada en ninguna población.

4.3.3 Resistencia a atrazina

En este caso, se observó una baja frecuencia de resistencia a lo largo de la mayoría de las poblaciones aplicadas (Tabla 15, Figura 22). Interesantemente, sólo la población 14 no presentó plantas resistentes, aunque no se descarta que sea consecuencia del particularmente bajo número de individuos estudiados en esta población. Algunas poblaciones exhibieron altas tasas de supervivencia, como las poblaciones 1 (95%) y 19 (46%) (Tabla 15).

La baja frecuencia de resistencia a atrazina en casi todas las poblaciones podría indicar que este herbicida es utilizado como un herbicida de "último recurso". Mientras que una aplicación de atrazina puede controlar a *A. tuberculatus* a un nivel razonable en la mayoría de los campos, la presencia de niveles mensurables de resistencia sugiere que una aplicación repetida podría conducir rápidamente a la falla del herbicida (Jasieniuk et al., 1996). El único mecanismo conocido de resistencia a atrazina asociado al sitio de acción en *A. tuberculatus*, la sustitución G264S en la proteína D1, no se observó en ninguna planta resistente (Tabla 15). Previamente, otro grupo de investigadores observaron una situación similar con la resistencia a atrazina en poblaciones de esta especie del estado de Missouri (Schultz et al., 2015).

Actualmente, no existen ensayos fiables basados en genómica para estudiar la resistencia a atrazina mediada por GST (glutación S-transferasa), por lo cual este mecanismo no asociado al sitio de acción no fue analizado.

Tabla 15. Mecanismos de resistencia a atrazina. n° S: número de plantas susceptibles. n° R: número de plantas resistentes.

Población	n° S	n° R	G264S	Desconocido
1	1	19	0	19
11	18	2	0	2
14	15	0	0	0
18	14	1	0	1
19	8	7	0	7
30	12	3	0	3
31	10	5	0	5
33	11	4	0	4
35	17	3	0	3
36	14	1	0	1
60	15	0	0	0
62	12	3	0	3
67	14	1	0	1

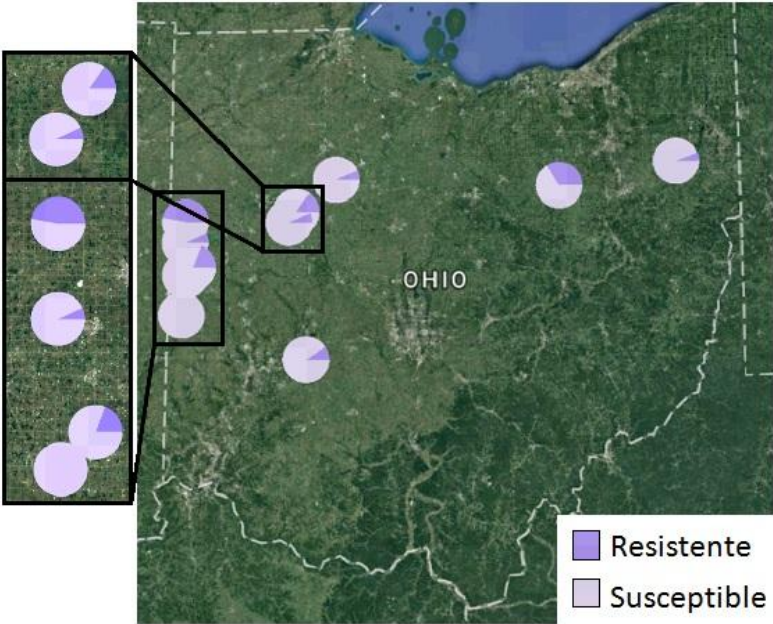


Figura 22. Distribución de la resistencia a atrazina en las poblaciones de *A. tuberculatus* de Ohio. La sustitución G654S no fue detectada en ninguna población.

4.3.4 Análisis integrado y perspectivas

A medida que nuevos alelos de resistencia son identificados y caracterizados, la fidelidad de la cuantificación de la resistencia mediante mecanismos moleculares se acerca cada vez más al fenotipado tradicional. Sin embargo, como se observa en este capítulo para la resistencia a glifosato, lactofen y atrazina en *A. tuberculatus*, existen zonas grises en el conocimiento de los mecanismos de resistencia. Las encuestas, censos y relevamientos proveen de una oportunidad única no sólo para cuantificar la resistencia campo a campo en extensas regiones, sino también para identificar poblaciones que posean nuevos alelos de resistencia plausibles de ser caracterizados. El relevamiento continuo de ciertas poblaciones permitirá incrementar el conocimiento acerca de cómo la resistencia a herbicidas evoluciona a lo largo de los años, a la vez que nos permitirá identificar aquellas poblaciones en las que nuevos mecanismos han aparecido en una frecuencia a la cual la caracterización se vuelve necesaria.

Un subgrupo importante de las poblaciones analizadas presentó resistencia múltiple a varios herbicidas. Siete de las poblaciones (1, 10, 18, 30, 31, 35 y 69) presentaron resistencia a dos sitios de acción diferentes, mientras que cinco poblaciones (19, 33, 36, 62 y 67) presentaron resistencia múltiple a los tres sitios de acción abordados. Si bien cada planta fue tratada con un único herbicida, se espera que la naturaleza alógama obligada de *A. tuberculatus* conduzca a la recombinación de los *loci* involucrados en la resistencia y a la generación de plantas con resistencia múltiple.

Finalmente, resulta pertinente resaltar nuevamente que sólo se seleccionaron campos infestados para este estudio. Por lo cual si una población tenía muy poca o ninguna resistencia al programa de herbicidas implementados en un campo dado, el campo no se consideraría para el muestreo. Este procedimiento probablemente enriqueció la muestra con poblaciones que presentan resistencia a los programas de herbicidas dominantes dentro de la región, y en consecuencia, se esperarían altos niveles de resistencia a al menos un herbicida (generalmente, a glifosato). Si se utilizara un enfoque de muestreo más aleatorio en todo el estado de Ohio, la frecuencia de resistencia observada en este proyecto probablemente disminuiría.

4.4 CONCLUSIONES

Este estudio sugiere que la resistencia a glifosato en *A. tuberculatus* está tan extendida en los cultivos de soja de Ohio como lo está en otros estados. El principal mecanismo de resistencia a glifosato parece ser la amplificación génica, aunque es muy probable que existan mecanismos de resistencia desconocidos dentro de las poblaciones analizadas. La resistencia a los herbicidas inhibidores de PPO parece poco frecuente, pero se concentra en pocas poblaciones, lo que brinda una oportunidad de control de dispersión de la resistencia. Se observó resistencia a atrazina a bajas frecuencias en casi todas las poblaciones ensayadas, lo cual indica que su capacidad de control sobre esta especie podría comenzar a fallar en un futuro cercano. Estos resultados en su conjunto permiten aceptar la hipótesis acerca de la presencia de niveles mensurables de resistencia a estos herbicidas en el estado de Ohio, planteada en la sección 4.1.



Regeneración in vitro de plántulas de trigo

CAPÍTULO 4

Los resultados descriptos a continuación fueron producto de la colaboración con otros miembros del laboratorio de Biología Molecular de la FCA-UNR. Mis agradecimientos para ellos. En especial, al Dr. Eduardo Daniel Souza Canada y al Dr. Hugo Permingeat.

CAPÍTULO 4

EXPRESIÓN DE ALELOS *als* RESISTENTES EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis thaliana* Y TRIGO

5.1 INTRODUCCIÓN

En un contexto donde la población mundial se proyecta en nueve mil setecientos millones de personas para el año 2050, se estima un incremento en la demanda de alimentos de un 50% y múltiples estudios indican que el aumento en el rendimiento de los cultivos es una necesidad inminente. El desafío más importante radica en el compromiso de desarrollar sistemas sustentables sin aumentar el área cultivable total y minimizando los recursos utilizados (Struik y Kuyper, 2017). Para ello, resulta clave el desarrollo de tecnologías que contribuyan a aumentar el rendimiento de los cultivos, ya sea directamente o mediante una mayor tolerancia a factores de estrés biótico y/o abiótico. Así, la biotecnología vegetal juega un rol clave en la satisfacción de estas demandas.

En las últimas décadas, la ingeniería genética ha permitido obtener grandes logros relacionados al incremento en la resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas en variedades de soja, maíz y algodón. De hecho, en Argentina ha habido un incremento incesante en la utilización de cultivos genéticamente modificados desde su primera incorporación a fines de la década de 1990. Un censo de la campaña 2016/2017 reveló que la superficie de cultivos transgénicos representa prácticamente al 100% de la superficie total de soja, al 100% de la superficie total de algodón y al 96% de la superficie total de maíz (ISAAA, 2017).

El trigo (*Triticum aestivum*) es uno de los cereales más importantes en el mundo y está estrechamente ligado al desarrollo económico, la seguridad alimentaria, la salud y la nutrición humana. Si bien se ha utilizado la modificación genética para mejorar la tolerancia al estrés, el rendimiento y la calidad del grano en esta especie, a diferencia de otros cultivos, aún no se ha comercializado trigo transgénico. Por el contrario, las variedades de trigo desarrolladas hasta la fecha se han obtenido principalmente por técnicas de mejoramiento clásicas, las cuales son muy lentas y, en muchos casos, conllevan dificultades para la hibridación de la especie dadora con la variedad de interés (Jauhar 2006).

Por su parte, las nuevas tecnologías que utilizan herramientas como la transgénesis y la edición génica ya han mostrado su potencial para desarrollar trigo transgénico (Li et al., 2012). Sin embargo, deben enfrentarse a una especie hexaploide, con un gran genoma, un alto número de secuencias repetidas de ADN y una limitada habilidad de regeneración (Bhalla, 2006). Adicionalmente, estos métodos requieren de la utilización de marcadores de selección para favorecer la multiplicación de las células iniciales transformadas. Si bien la aplicación de marcadores de selección en el proceso de transgénesis ha permitido incrementar la eficiencia del proceso, la remanencia de los mismos dentro de los genomas vegetales podría eventualmente representar efectos indeseados en la variedad transformada, y hasta en la salud y el medio ambiente (Li et al., 2012). Un nuevo evento biotecnológico recientemente desarrollado en Argentina, llamado trigo HB4 (Trigall Genetics), representa la primera posibilidad en el mundo para la comercialización de trigo transgénico. El trigo HB4, tolerante a sequía y al herbicida glufosinato de amonio (inhibidor de la glutamina sintetasa), fue lanzado públicamente y logró dictámenes favorables de la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (Conabia) y del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa).

Mayoritariamente, los marcadores de selección utilizados para la transformación de trigo hasta el momento consistieron en genes bacterianos de resistencia a antibióticos (*nptII*, *hpt*) (Ortiz et al., 1996) o en genes bacterianos de resistencia a herbicidas (*bar*, CP4) (Sahrawat et al., 2003). Así, podría existir un riesgo –por más pequeño que sea– de transferencia de genes de resistencia a antibióticos a bacterias patógenas o de genes de resistencia a herbicidas a malezas problemáticas (Puchta, 2000; Smalla et al., 2000).

Algunos investigadores han propuesto estrategias para remover los agentes de selección luego de la transformación, como la co-transformación (Permingeat et al., 2003), la recombinación sitio-específica (Srivastava y Ow, 2004) y la eliminación mediada por transposones (Puchta, 2003). Inclusive es posible transformar sin utilizar un marcador de selección (Permingeat et al., 2003), pero esto involucra el *screening* de un número muy elevado de explantos. A través de la co-transformación, se logra la integración independiente del transgén de interés y el marcador de selección, posibilitando la segregación de estos dos genes en las próximas generaciones, como ya se ha demostrado en trabajos previos (Yao et al., 2006; Yao et al., 2007).

En contraste a los marcadores de selección convencionales, algunos genes derivados de plantas resultan prometedores debido a su mayor eficacia de transformación y a un potencial menor impacto en la salud y el medio ambiente (Gao et al., 2011). Particularmente, Ogawa et al. (2008) obtuvieron una alta eficiencia de transformación de la variedad Bobwhite de trigo utilizando una versión del gen de la ALS de arroz portando las sustituciones W574L y S653I en simultáneo. En este trabajo fueron capaces de seleccionar plantas transformantes utilizando bispiribac sódico, un principio activo perteneciente a la familia de los pirimidiniltiobenzoatos (PTB). En dicha investigación se utilizaron las regiones promotoras y terminadoras del gen original de arroz, y no se testeó el fenotipo de resistencia a herbicidas de otras familias de inhibidores de la ALS.

El objetivo de este capítulo consistió en la construcción de vectores de expresión portadores de distintas versiones del gen *als* bajo el control de un promotor constitutivo fuerte, para ser utilizados como genes selectores en eventos de co-transformación de trigo. De esta forma, se procuró el desarrollo de una herramienta que permitiera utilizar bajas concentraciones de múltiples agentes de selección cuya resistencia esté aportada por un único gen. Para ello, se realizaron inicialmente pruebas de concepto en *Arabidopsis thaliana* mientras se optimizaban los medios y condiciones para la embriogénesis somática de trigo mediante cultivo *in vitro*. A partir de un modelado estructural tridimensional se hipotetizó que las sustituciones A282D y W574L (halladas en *A. palmeri* en el Capítulo 1) ocurriendo en simultáneo, podrían significar una mayor resistencia a inhibidores de la ALS, por lo cual se decidió analizar la funcionalidad de esta versión alélica en comparación con la de los alelos *als282* y *als574*, analizados individualmente.

Objetivo

Desarrollar un marcador de selección para co-transformación de trigo a partir de un gen *als* que otorgue resistencia a las cinco familias de herbicidas pertenecientes al grupo B.

Hipótesis de trabajo

Una versión mutada del gen *als* de *A. palmeri* puede utilizarse como marcador de selección para la transformación de trigo, otorgando resistencia a distintas familias de herbicidas inhibidores de la ALS.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Construcción de vectores de expresión para *Arabidopsis thaliana*

Inicialmente, cuatro versiones del gen *als* fueron subclonadas en un vector de expresión apto para *A. thaliana*. Estas versiones fueron nombradas como: “alsWT” (de *wild type*), “als282”, “als574” y “alsR” (para aquella versión portando las sustituciones 282 y 574, cuya funcionalidad se quería evaluar). La versión alsR fue sintetizada artificialmente en GenScript dentro de un vector pUC19, mientras que las versiones alsWT, als282 y als574 fueron obtenidas a partir de los plásmidos construidos en el capítulo 1 (Tabla 5, Alelos A, B y C, respectivamente). Se diseñaron oligonucleótidos específicos que amplifican el gen *als* en su totalidad (X8: 5'-GCGTAGGAGCTCGACTAAGCTTCAACAATGG-3' y X9: 5'-CGCTCCACTAGTCCTACAAAAAGCTTCTCTCT-3') y que incluyen los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción SpeI y SacI, de manera de generar sitios compatibles con el vector de expresión en plantas pZAV (construido a partir del vector pTF101.1).

Las reacciones de amplificación consistieron en ~10 ng de plásmido molde, 500 nM de oligonucleótidos, 1,5 mM de MgCl₂, 200 μM de dNTPs, 1X de buffer, 1 unidad de Q5[®] High-Fidelity DNA polymerase (polimerasa de alta fidelidad, New England Biolabs), y H₂O ultrapura hasta alcanzar un volumen final de 50 μL. Las condiciones de ciclado fueron: 98 °C durante 1 min, 35 ciclos de 98 °C durante 10 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min, y un intervalo de extensión final a 72 °C durante 7 min.

Los productos de amplificación y el vector pZAV fueron digeridos durante 1 h a 37 °C con las enzimas de restricción SpeI y SacI (Promega) en reacciones que consistieron en: 10 μL del ADN molde, 1 unidad de cada enzima, 0,3 μL de buffer 10X Multi-Core (Promega) y H₂O ultrapura hasta alcanzar un volumen final de 30 μL. Cada inserto digerido se ligó al vector pZAV previamente linealizado, durante 16 horas a 4 °C en reacciones que consistieron en: 6 μL de inserto *als* digerido, 2 μL de vector pZAV digerido, 1 unidad de T4 DNA ligasa (Promega), 1 μL de buffer 10X T4 DNA liagasa. Paso siguiente, se transformaron células competentes de *E. Coli* DH5α con cada una de las ligaciones, de acuerdo a protocolos estándar (Sambrook y Russell, 2001). Las transformantes fueron seleccionadas en placas con medio Luria-Bertani (LB) suplementadas con 100 μg/mL de espectinomicina, antibiótico para el cual el vector pZAV otorga resistencia.

La integración del inserto fue chequeada por PCR de colonia con los oligonucleótidos pLL15 (5'-TGTGATATCTCCACTGACGTAAGG-3') y X4 (Tabla 2). Para ello, se inocularon colonias individuales en tubos conteniendo 25 µL de agua destilada y los mismos fueron sometidos a 100 °C durante 10 min. Alícuotas de 1 µL de estas suspensiones se utilizaron como molde para la amplificación, que siguió el protocolo descrito al inicio de esta sección, con las siguientes modificaciones: se amplificó con la enzima GoTaq DNA polimerasa (Promega), el tiempo de extensión fue de 45 s y la temperatura de hibridación fue de 58 °C. Los productos de amplificación se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1% y, en base a la presencia de un producto de 855 pb, se seleccionaron cuatro colonias positivas para cada versión alélica. A partir de las mismas se iniciaron cultivos en 5 mL de medio LB líquido suplementado con 100 µg/mL de espectinomicina que fueron incubados a 37 °C durante toda la noche.

Finalmente, se realizaron minipreparaciones plasmídicas, de acuerdo al protocolo de purificación de ADN plasmídico de Promega (Wizard® Plus SV Minipreps, DNA Purification System protocol, Promega). Los plásmidos recombinantes fueron nuevamente chequeados, mediante digestión con la enzima de restricción EcoRI y electroforesis de los fragmentos de ADN en gel de agarosa al 1%. Confirmado el patrón de digestión esperado, los plásmidos se enviaron a secuenciar (Marcogen Inc., Korea) utilizando los oligonucleótidos X5, X6 y X7 diseñados para cubrir la totalidad del marco abierto de lectura del gen *als* (Tabla 2).

5.2.2 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* y de *Arabidopsis thaliana*

Se procedió a realizar la transformación por electroporación de células competentes de la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*, que dispone del background genético para infectar plantas de *A. thaliana* eficientemente. La preparación de células competentes GV3101 fue realizada de acuerdo a Wang (2006) y la transformación fue realizada mediante un electroporador MicroPulser (Biorad) con plásmidos pZAVals conteniendo cada una de las versiones alélicas, según se detalla en el manual del fabricante. Aquellas colonias transformadas de *A. tumefaciens* capaces de crecer en medios LB suplementados con Rifampicina 50 µg/mL, Gentamicina 25 µg/mL y Espectinomicina 100 µg/mL (medio LB-RGE) fueron chequeadas por PCR de colonia (según lo descrito en 5.2.1). Posteriormente, se iniciaron cultivos de 2 mL de medio LB-RGE para cada colonia positiva durante 16 horas a 28 °C y luego se

amplificaron a 200 mL para ser utilizados en la infiltración de plantas de *A. thaliana*. Por su parte, las plantas de *A. thaliana* fueron crecidas durante siete semanas en cámara de cultivo bajo un fotoperíodo de 16 h, una temperatura de 22-23 °C, una intensidad lumínica de 110-140 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y una humedad del 40-60%. La transformación, conocida como “floral dip”, se realizó sumergiendo 20 plantas de *A. thaliana* por construcción en un medio conteniendo los precipitados bacterianos de *A. tumefaciens* resuspendidos en 5 % de sacarosa y 0,5 % de Silwet L-77 (Wang, 2006). Las macetas se colocaron en posición horizontal y se cubrieron con bolsas para mantener la humedad durante 72 horas. Cumplido este plazo, fueron colocadas en posición vertical nuevamente para que las plantas completen su ciclo de vida, momento en el cual dejaron de regarse y fueron conducidas a madurez para colectar las semillas y realizar la selección de transformantes en la progenie.

5.2.3 Selección y chequeo de las transformantes

Las semillas de *A. thaliana* obtenidas (T1), fueron crecidas y seleccionadas tanto en maceta por rociado con glufosinato de amonio 300 μM , como en medios de cultivo semisólidos artificiales (MS-agar 1%) suplementados con 10 mg/mL de glufosinato de amonio. Esta última concentración fue determinada mediante la construcción de una curva de selección en donde se creció al ecotipo salvaje Col0 en presencia de 0, 1, 10, 50 y 100 mg/mL de glufosinato de amonio. En todos los ensayos se utilizaron plantas Col0 sin transformar como controles negativos de crecimiento en los medios selectivos. Las plantas resistentes fueron trasplantadas y sus hojas fueron utilizadas para extracción de ADN genómico y posterior confirmación de transgénesis por una reacción de PCR específica para la construcción que amplifica un fragmento quimérico (vector-inserto) de 855 pb (oligonucleótidos pLL15 y X4, protocolo descrito en la sección 5.2.1).

Dado que las plantas T1 son hemicigotas, algunos individuos de la generación T2 provenientes de la autopolinización de cada evento no contendrán el transgén. Así, la T2 fue sometida a aplicaciones de glufosinato de amonio 300 μM para obtener una generación T3 con mayor proporción de individuos transgénicos. Adicionalmente, el chequeo de una segregación 3:1 en la generación T2 permite descartar la presencia de eventos de inserción múltiple o complejos (Wang, 2006). Los individuos de la generación T3 sobrevivientes al agente de selección fueron utilizados en los ensayos que se describen a continuación.

5.2.4 Evaluación de la resistencia en las plantas transgénicas

5.2.4.1 Niveles de expresión del transgén

Se realizó la extracción de ARN y síntesis de ADNc a partir de tres plantas individuales de cada evento transgénico y de plantas Col0 siguiendo el protocolo detallado en 3.2.2.6. Los niveles de expresión del transgén se estudiaron a través de la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real. Un fragmento de 62 pb del transgén fue amplificado por los siguientes oligonucleótidos específicamente diseñados: p16als (directo), 5'-GGCACATACATACCTCGGGA-3' y p17als (reverso), 5'-ATTTGAGCATATCCGGGAAG-3'. El gen codificante de la PDF2 (subunidad regulatoria de la proteína-fosfatasa 2A) fue utilizado como gen endógeno de referencia previamente validado (Czechowski et al., 2005), amplificándose un fragmento de 61 pb con los siguientes oligonucleótidos: pEND1 (directo), 5'-TAACGTGGCCAAAATGATGC-3' y pEND2 (reverso), 5'-GTTCTCCACAACCGCTTGGT-3'. Las reacciones fueron preparadas en un volumen final de 25 µL, conteniendo 200 nM de los oligonucleótidos específicos, 1X de RealMix qPCR de Biodynamics y 0,5 µL de ADNc. Cada réplica biológica fue procesada por triplicado técnico. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen) programado como se detalla en la sección 2.2.4.3. El experimento incluyó un control negativo con molde sin retrotranscribir para descartar la presencia de ADN remanente en las muestras. Las cuantificaciones comparativas de los valores Ct (método $\Delta\Delta Ct$) fueron hechas con el software REST (Pfaffl et al., 2002). Las medidas de cuantificación relativa fueron utilizadas para expresar los resultados como el número de veces en que la expresión del transgén se vio “modificada” respecto a las plantas transformadas con la versión alsWT. Las diferencias estadísticamente significativas fueron estimadas a través del test de aleatorización provisto por el software REST. El evento que presentó mayor expresión fue utilizado en los ensayos que se describen en las secciones siguientes.

5.2.4.2 Actividad ALS

Se obtuvieron extractos crudos de la enzima ALS a partir de las hojas de diez plantas T3 seleccionadas del evento alsR1, del evento alsWT y de diez plantas Col0. Los extractos fueron a su vez parcialmente purificados por precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ y posteriormente

sometidos a ensayos de actividad *in vitro* en ausencia de herbicidas y en presencia 1 y 50 μM de imazetapir, 10 μM de clorimurón-etil y 10 μM de diclosulam; mediante el método de Westerfeld modificado. Se analizaron tres réplicas técnicas por extracto. Los protocolos de extracción y medición de actividad han sido descritos previamente por Poston et al. (2002) y Yu et al. (2010), respectivamente. Los valores obtenidos fueron sometidos a un análisis de la variancia (ANOVA) unifactorial en el software Sigma-Plot y las diferencias estadísticamente significativas se estimaron mediante el test de Holm-Sidak con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$).

5.2.4.3 Crecimiento en medios suplementados con inhibidores de la ALS

Paralelamente a los ensayos descritos previamente, cerca de 300 semillas T3 del evento alsR1 y del evento alsWT fueron sembradas en placas MS-agar 1% suplementadas con 0, 0,1, 1 y 10 μM de imazetapir, clorimurón-etil y diclosulam. Las placas fueron incubadas a 22 °C en cámara de cultivo bajo un fotoperíodo de 12 h y una intensidad lumínica de 200 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$. Cumplido un plazo de diez días, se registró fotográficamente el crecimiento de cada evento bajo las distintas condiciones. Estos experimentos fueron repetidos dos veces.

5.2.4.4 Curvas dosis-respuesta por riego

Se realizó un ensayo *in vivo* adicional que consistió en el regado de plantas T3 de los eventos alsR1, alsWT y plantas del ecotipo Col0 con agua, imazetapir 0,1 μM , imazetapir 1 μM , clorimurón-etil 1 μM y diclosulam 1 μM (por separado). Los tratamientos comenzaron cuando las plantas alcanzaron un estadio de cuatro hojas y consistieron en tres réplicas (macetas) de cuatro individuos. Luego de seis semanas de regado por capilaridad con 200 mL de cada solución con una frecuencia de tres días, se registró fotográficamente el desarrollo de las plantas y cada una de ellas fue cosechada y secada hasta pesada constante. El peso seco promedio se comparó entre eventos y entre tratamientos con herbicidas por medio de un análisis de la variancia (ANOVA) utilizando el software Sigma-Plot.

5.2.5 Construcción de vectores pMF6als para expresión en trigo

Se procedió a la construcción de vectores de expresión portando distintas versiones del gen *als* para ser potencialmente utilizados como genes selectores en eventos de co-transformación de trigo. Se llevó a cabo el subclonado en el vector pMF6 de tres versiones alélicas (*als*WT, *als*282 y *als*574) previamente clonadas en los vectores de expresión pGEM-T Easy. El vector de expresión pMF6 contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el primer intrón de la alcohol deshidrogenasa 1 de maíz (*Adhl1*) y la región de poliadenilación de la nopalina sintasa (*nos*) de *Agrobacterium tumefaciens*, siendo ideal para la expresión en monocotiledóneas (Callis et al., 1987). Sin embargo, carece de marcadores de selección para transformación vegetal.

La estrategia completa de subclonado fue similar a la descrita para el vector pZAV en la sección 5.2.1, con las siguientes modificaciones. La amplificación de las versiones alélicas *als* en los vectores de partida se realizó con los oligonucleótidos X10 (5'-CGGGATCCCTTCAAGCTTCAACAATGG-3') y X11 (5'-GGGGTACCCCTACAAAAAGCTTCTCCTCT-3'), conteniendo los sitios de restricción BamHI y KpnI compatibles con el vector pMF6. La digestión de los insertos y el vector se realizó con las enzimas de restricción BamHI y KpnI (Promega). La integración del inserto fue chequeada por PCR de colonia con los oligonucleótidos X1 y X4 (Tabla 2), utilizando colonias no transformadas como control negativo de amplificación endógena. Los plásmidos recombinantes obtenidos fueron chequeados previo a la secuenciación mediante digestión con la enzima de restricción HindIII (Promega) y electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

5.2.6 Construcción de curvas de selección con imazetapir en cultivo *in vitro* de trigo

Se iniciaron cultivos *in vitro* de trigo del cultivar Klein Brujo a partir de embriones inmaduros de 0,2-0,5 mm para la inducción de callos embriogénicos. Las plantas de trigo dadoras fueron geminadas y crecidas en macetas con una mezcla 70:20:10 tierra:arena:perlita a 19-22 °C, 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ de intensidad lumínica, un fotoperíodo de 16 h y una humedad del 40-60%. Los embriones fueron extraídos bajo lupa en campana de flujo laminar y posicionados con el escutelo hacia arriba en placas con medio MS-IND, las cuales fueron incubadas en oscuridad a 25 °C. El medio MS-IND se formuló de la siguiente manera: 4,3 g/L de una mezcla de sales basales MS (M5524, Sigma-Aldrich), 1 g/L de vitaminas MS (M7150,

Sigma-Aldrich), 30 g/L de maltosa, 1mg/L de 2,4 D (D7299, Sigma-Aldrich), 100 mg/L de glutamina 100 mg/L de asparagina, 150 mg/L de prolina y 8 g/L de agar. Los aminoácidos se prepararon en una solución concentrada, se esterilizaron por filtrado y se agregaron al medio con el resto de las sustancias luego de su ajuste a pH 5,8 y autoclavado. A partir de la segunda semana de incubación en medio MS-IND, se desarrollaron curvas de selección en el mismo medio suplementado con 0, 1, 2 y 5 μ M de imazetapir. Luego de cuatro semanas, se evaluó el porcentaje de inducción y los callos fueron transferidos a un medio de regeneración de plantas, MS-REG, suplementado con las mismas concentraciones de imazetapir. El medio MS-REG se formuló de la siguiente manera: 4,3 g/L de una mezcla de sales basales MS (M5524, Sigma-Aldrich), 1 g/L de vitaminas MS (M7150, Sigma-Aldrich), 30 g/L de maltosa, 0,5 mg/L de BAP (bencilaminopurina), 0,05 mg/L de AAN (ácido alfa-naftalenacético) y 8 g/L de agar. El medio fue ajustado a pH 5,8 y todos sus componentes fueron autoclavados. Cumplido un lapso de cuatro semanas de incubación a 25 °C con un fotoperíodo 12/12 hs luz/oscuridad y una intensidad lumínica de 250 μ mol/m²s, se evaluaron los porcentajes de regeneración. Cada tratamiento consistió en tres repeticiones (placas individuales) conteniendo 20 embriones. Para cuantificar los niveles de inducción y regeneración en cada explanto se utilizó una escala del 1 al 5, donde 1 implicó ausencia de callos o partes verdes respectivamente, 2, 3 y 4 cantidades sucesivamente mayores y 5, el mismo nivel de inducción o regeneración que los explantos de los controles crecidos en medios no selectivos (sin imazetapir).

5.2.7 Transformación y selección *in vitro* de trigo transgénico

5.2.7.1 Pretratamiento de los explantos

Se extrajeron embriones inmaduros de trigo del cultivar Klein Brujo según lo descrito en la sección 5.2.6. Los embriones fueron inmediatamente incubados en placas con medio MS-IND en oscuridad a 25 °C durante 4 días. Luego, fueron transferidos a otro medio para realizarles un tratamiento osmótico que favorece la deshidratación del callo formado y la incorporación del transgén. Este medio, llamado MS-OSM, tuvo la misma composición que el medio MS-IND con el agregado adicional de manitol 0,5 M. Los callos se incubaron en este medio durante 4 horas en oscuridad y a 25 °C y luego fueron bombardeados con

micropartículas de tungsteno cargadas con los plásmidos pMF6als, como se detalla en las siguientes secciones.

5.2.7.2 Preparación de las micropartículas recubiertas con ADN

Se suspendieron 50 mg de partículas de tungsteno de 1 μm de diámetro (M17, Biorad) en 1 mL de isopropanol. Posteriormente, se realizó un pulso de sonicación durante 1 segundo y se centrifugó la muestra a 2000 g durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con 1 mL de agua destilada estéril en agitación vigorosa. Se centrifugó a 2000 g y se descartó el sobrenadante. Este lavado se repitió tres veces y finalmente se resuspendieron las partículas en 1 mL de agua destilada estéril de manera de lograr una concentración de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Las partículas se almacenaron en freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

La precipitación del ADN (plásmidos pMF6alsWT, pMF6als282 y pMF6als754) sobre las partículas de tungsteno se realizó en alícuotas con un volumen suficiente para cuatro disparos. Inicialmente, se colocaron 65 μL de la suspensión de partículas en un tubo de 1,5 mL. A continuación, se agregaron 10 μg de plásmido (2,5 $\mu\text{g}/\text{disparo}$) o agua destilada estéril en el caso de los controles sin vector. Inmediatamente se agregaron 75 μL de nitrato de calcio 1 M pH 10 y se agitó en vórtex durante 1 min. Se realizó una incubación en hielo durante 10 min seguida de una centrifugación durante 1 min a 3000 g. Se descartó el sobrenadante, se lavaron las partículas con isopropanol 70% v/v y se las centrifugó nuevamente durante 1 min a 3000 g. Finalmente, las partículas se resuspendieron en 65 μL de isopropanol puro y alícuotas de 15 μL fueron utilizadas para cada disparo.

5.2.7.3 Bombardeo con acelerador de micropartículas

Los disparos se realizaron en tres momentos independientes, sobre un total de 12 placas por construcción, cada una de ellas conteniendo entre 20 y 35 callos. Así, el número total de callos disparados por construcción fue de aproximadamente 300. En paralelo al control de transformación con el plásmido portando la versión alsWT, se realizaron otros controles. Por un lado, el control de selección, que consistió en placas conteniendo callos bombardeados con partículas vacías (sin plásmido) y sometidos al agente de selección. Este control permitió detectar/descartar la presencia de escapes durante el proceso de selección. Adicionalmente, como la selección se realiza durante la etapa de regeneración, este control

permitió corroborar si las condiciones del tratamiento osmótico, el bombardeo y la inducción fueron las propicias para el desarrollo normal de los explantos. Por otro lado, el control de regeneración, que consistió en placas con explantos crecidos sin bombardear y sin seleccionar. Este control permitió corroborar si las condiciones de regeneración fueron las apropiadas para el desarrollo normal de los explantos.

Previo al bombardeo, se encendió la campana de flujo laminar y se realizó la esterilización del acelerador de micropartículas y todos sus accesorios con etanol 70% v/v. Los macrocarriers y los discos de ruptura fueron esterilizados con etanol 70% v/v durante 15 minutos y luego sumergidos en etanol absoluto y secados dentro de la campana. Luego, los macrocarriers fueron colocados dentro de los holders utilizando pinzas esterilizadas a la llama. Armado el sistema (como se muestra en la Figura 23), se efectuaron los bombardeos utilizando el acelerador de micropartículas Biomics. La presión de helio utilizada correspondió a 1200 psi por disparo y la distancia de la muestra a las micropartículas fue de 6 cm (condiciones previamente optimizadas).

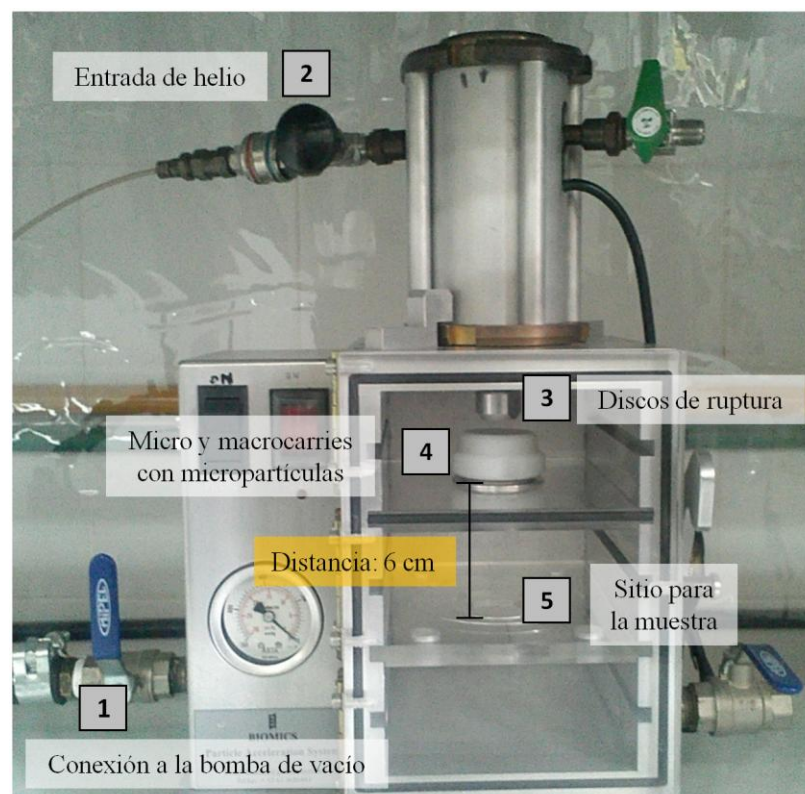


Figura 23. Acelerador de micropartículas Biomics.

5.2.7.4 Selección de los explantos transgénicos

Luego de los bombardeos, los callos permanecieron en el medio MS-OSM durante 16 horas en oscuridad a 25 °C antes de ser devueltos al medio de inducción MS-IND original (no selectivo). La etapa de inducción continuó durante cuatro semanas con una transferencia a medio fresco a mitad del intervalo. Posteriormente, los callos fueron transferidos a medios MS-REG suplementados con 1 μ M de imazetapir para seleccionar aquellos que desarrollaran estructuras vegetativas en presencia del agente de selección. Aquellos explantos que mostraron desarrollo de vástago luego de cuatro semanas, fueron transferidos a frascos de vidrio estériles de siete cm de alto conteniendo medio MS-REG para posibilitar un mejor desarrollo en altura. Luego de 15 días, estos individuos fueron transferidos a medios de enraizamiento (MS-ENR) e incubados bajo las mismas condiciones que durante la regeneración, de manera de favorecer el desarrollo del sistema radicular. Este medio se formuló de la siguiente manera: 4,3 g/L de mezcla de sales basales MS (M5524, Sigma-Aldrich), 1 g/L de vitaminas MS (M7150, Sigma-Aldrich), 30 g/L de maltosa, 10 g/L de carbón activado y 8 g/L de agar. El pH fue ajustado, al igual que para los otros medios, a un valor de 5,8. Las plántulas que lograron su desarrollo fueron transferidas a vasos plásticos conteniendo perlita y cubiertos con bolsas plásticas para promover una aclimatación gradual y mantener un ambiente con alta humedad. Finalmente, las plantas fueron transferidas a tierra para completar su ciclo de vida y posibilitar la recolección de semillas.

5.2.7.5 Confirmación de transgénesis

Se realizó un chequeo de incorporación del inserto para validar que la supervivencia al medio MS-REG selectivo fuese otorgada por el transgén. Para ello, se realizó la extracción de ADN de tejido foliar de las plantas recién transferidas a macetas, siguiendo las instrucciones del kit de extracción de ADN genómico Wizard (Promega Corp., Madison, WI). Acto seguido, se llevó a cabo una reacción de PCR que específicamente amplifica un fragmento del transgén. Como control de especificidad, se utilizó el ADN extraído de plántulas no transformadas regeneradas en medios no selectivos. Como control positivo de amplificación, se utilizó el plásmido pMF6alsWT como molde. Los oligonucleótidos utilizados (X1 y X4, Tabla 2) amplifican un fragmento de 670 pb del transgén. Las reacciones de amplificación consistieron en 100 ng de ADN molde, 500 nM de oligonucleótidos, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200

μM de dNTPs, 1X de buffer, 1 unidad de GoTaq DNA polimerasa (Promega), y H_2O ultrapura hasta alcanzar volumen final de 25 μL . Las condiciones de ciclado fueron: 98 °C durante 3 min, 35 ciclos de 98 °C durante 10 seg, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min, y un intervalo de extensión final a 72 °C durante 7 min.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Construcción de vectores de expresión para *A. thaliana*

La estrategia de subclonado utilizada permitió construir diferentes versiones del vector pZAVals. Los vectores están constituidos por una de las versiones *als* (WT, als282, als574 y alsR) bajo control transcripcional del promotor CaMV 35S y el terminador tNOS. El vector también contiene el gen *aadA* que otorga resistencia a espectinomicina para selección de bacterias transformantes y el gen *bar* que otorga resistencia a glufosinato de amonio para selección de plantas transformantes (Figura 24). Como resultado de la digestión de los plásmidos recombinantes con la enzima de restricción EcoRI, pudieron observarse los tres fragmentos de ADN del tamaño esperado (930, 1320 y 9800 pb) en un gel de agarosa al 1 % (Figura 24, recuadro azul). Este chequeo, sumado a la amplificación de un fragmento quimérico por PCR y su posterior secuenciación, permitió corroborar la incorporación del inserto, su secuencia y su correcta orientación en todos los plásmidos recombinantes.

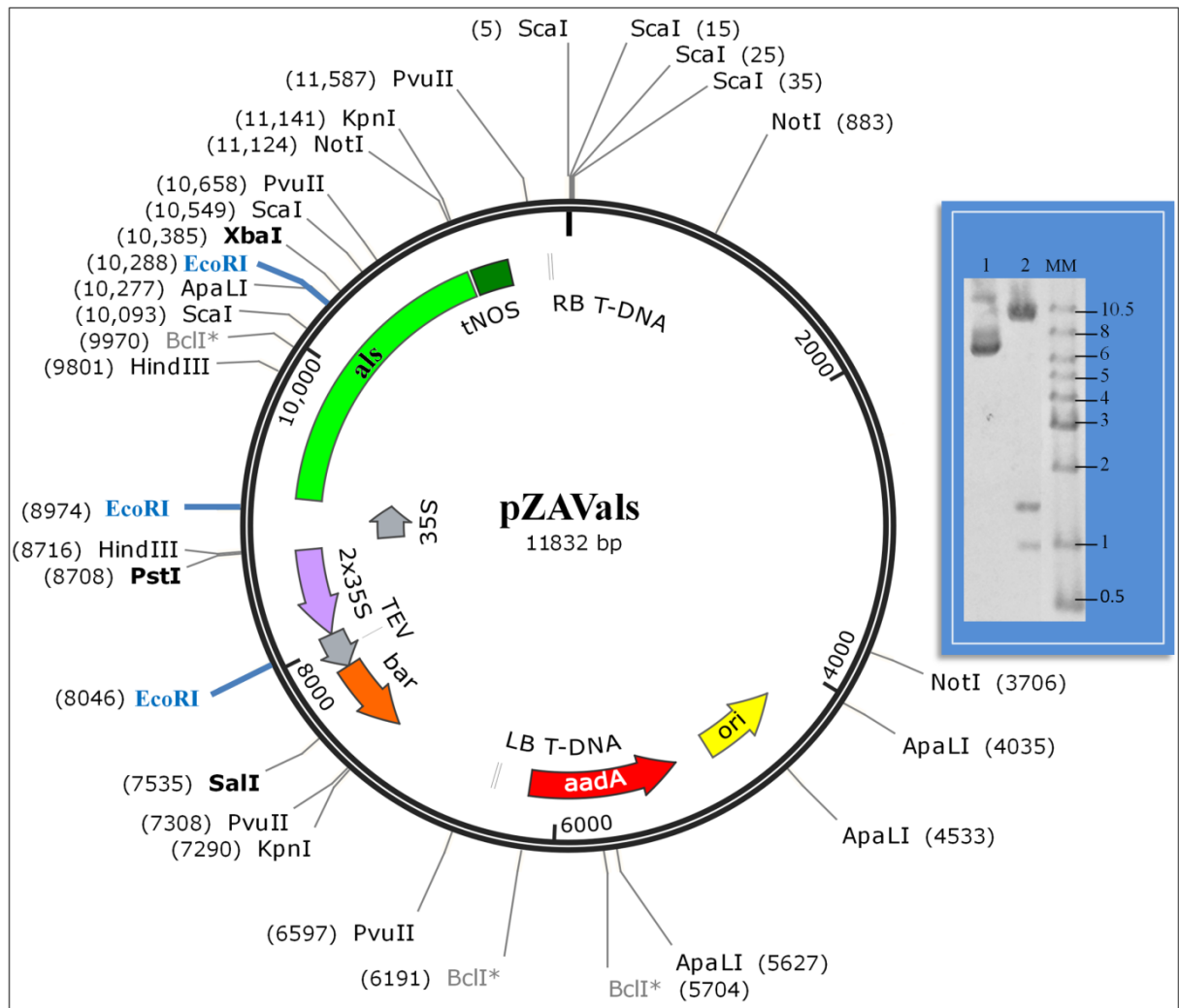


Figura 24. Construcción de los vectores pZAVals. En el mapa del vector se puede observar el gen *aadA*, que confiere resistencia a espectinomicina y el gen *bar*, que confiere resistencia a glufosinato de amonio. Se construyeron las versiones *als*WT, *als*282, *als*574 y *als*R (282+574). A la derecha, se puede observar un gel de agarosa donde uno de los plásmidos pZAVals fue sembrado sin digerir (1) y digerido con *EcoRI* (2). Se corroboró la presencia de las tres bandas del peso molecular esperado para un plásmido recombinante que incorporó el inserto *als*.

5.3.2 Selección de plantas de *A. thaliana* transgénicas

Las curvas de selección en placa para el ecotipo salvaje Col0 permitieron definir una concentración umbral a partir de la cual pudieron seleccionarse las transformantes de *A. thaliana* (Figura 25A). La concentración de glufosinato de amonio escogida con dicho fin fue de 10 mg/mL, ya que resultó en una inhibición sustancial del crecimiento del control.

Del total de semillas analizadas, fue posible seleccionar cuatro plantas sobrevivientes: 1 perteneciente a la construcción alsWT y tres pertenecientes a la construcción alsR (llamadas alsR1, alsR2 y alsR3). No pudieron seleccionarse, a pesar de la continua repetición de los experimentos de transformación y selección, líneas para las construcciones portadoras de los alelos als282 y als574. En la Figura 25E, puede observarse un único fragmento de ADN de aproximadamente 855 pares de bases amplificado a partir del ADN genómico de dichas plantas sobrevivientes, que coincide con el patrón de amplificación del control positivo utilizando el plásmido recombinante como molde (C+). Además, la ausencia de amplificación en el control negativo (g-: ADN genómico de una planta Col0) y en el control sin molde (C-), aseguraron la especificidad de la reacción y descartaron la posibilidad de una contaminación. La línea transgénica alsR3 se seleccionó en un experimento posterior al que permitió la selección de las líneas alsR1 y alsR2.

Luego del crecimiento y recolección de semillas de las plantas transformantes, la progenie (T2) de cada evento fue evaluada para confirmar la resistencia y calcular el porcentaje de segregación. Las plantas mostraron un buen crecimiento y entre el 67-79 % de ellas fueron capaces de sobrevivir a la aplicación reiterada de glufosinato de amonio 300 μ M (Tabla 16). Este porcentaje se acerca a la proporción esperada según herencia mendeliana (3:1), por lo cual sería de esperar que los eventos de inserción no hayan sido múltiples ni complejos.

Tabla 16. Porcentaje de plantas T2 transgénicas sobrevivientes a aplicaciones de glufosinato de amonio 300 μ M.

Evento	Nº T2 aplicadas	Nº T2 sobrevivientes	% de sobrevivientes
alsWT	172	136	79,1 %
alsR1	172	121	70,3 %
alsR2	170	119	70 %
alsR3	162	108	66,7 %

Se avanzó con el análisis de las líneas transgénicas que se pudieron seleccionar, con el objetivo de evaluar, al menos, los niveles de resistencia a inhibidores de la ALS aportados por el alelo alsR.

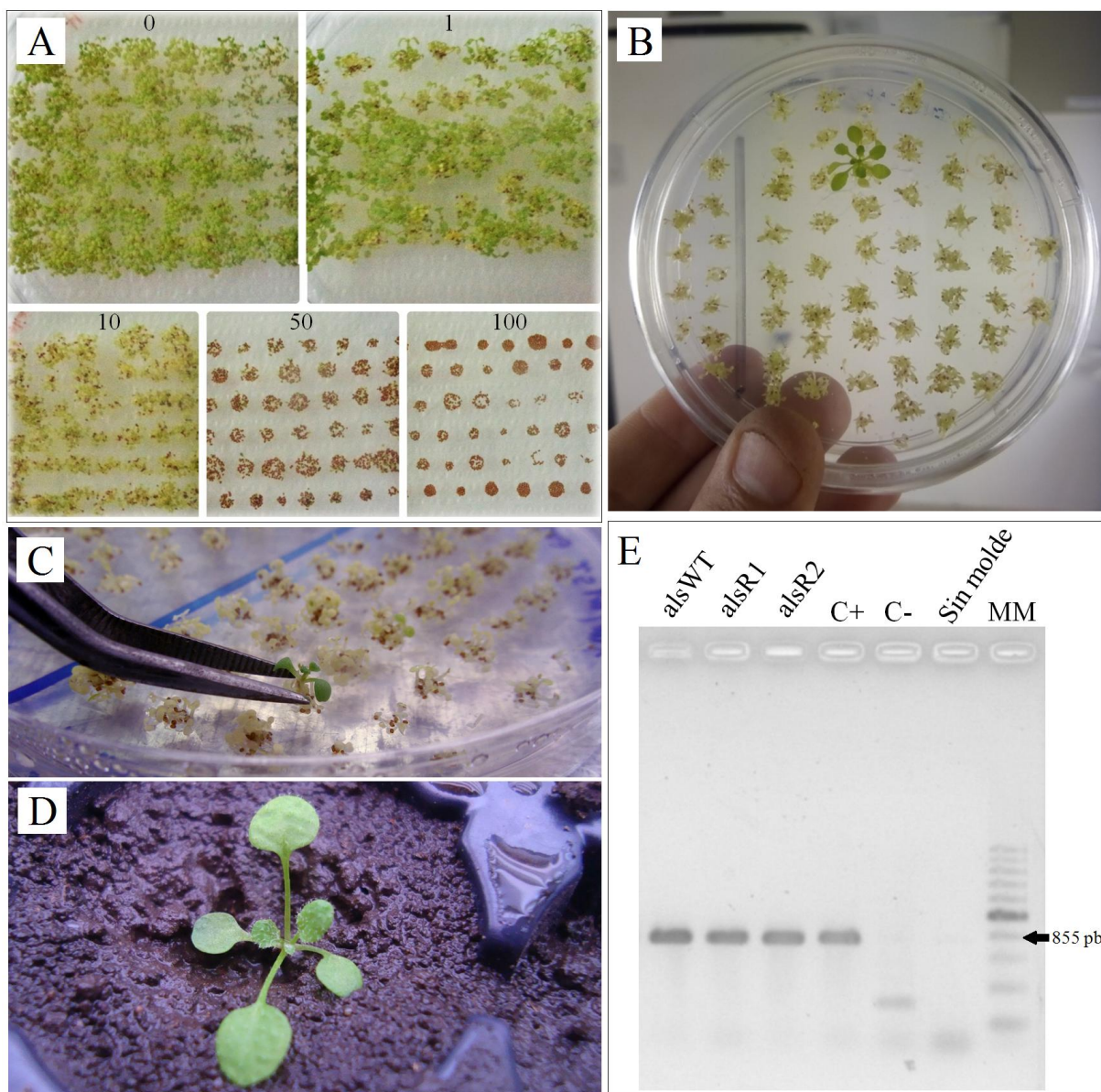


Figura 25. Selección de eventos transgénicos. A: Curva de selección del ecotipo Col0 en medios MS suplementados con distintas concentraciones de glufosinato de amonio, expresadas en mg/mL. B y C: Selección de transformantes en medios MS suplementados con 10 mg/mL de glufosinato de amonio. D: Trasplante a tierra de las plántulas. E: Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados con oligonucleótidos específicos para el transgén (855 pb).

5.3.3 Análisis de la resistencia en las líneas transgénicas de *A. thaliana*

5.3.3.1 Niveles de expresión

Se analizaron los niveles de expresión relativos del transgén en los cuatro eventos seleccionados: alsWT, alsR1, alsR2 y alsR3. Los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real

permitieron validar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados sobre los genes blanco, ya que las curvas de fusión indicaron picos únicos para los genes *als* y *pdf2*. Como puede observarse en la Figura 26, los niveles de expresión relativa en el evento alsR1 resultaron mayores que para el resto de las líneas alsR, por lo cual se decidió utilizar esta línea para los estudios fenotípicos que se describen a continuación. Cabe destacar que no hubo diferencias significativas entre los niveles de expresión de las líneas transgénicas alsWT y alsR1.

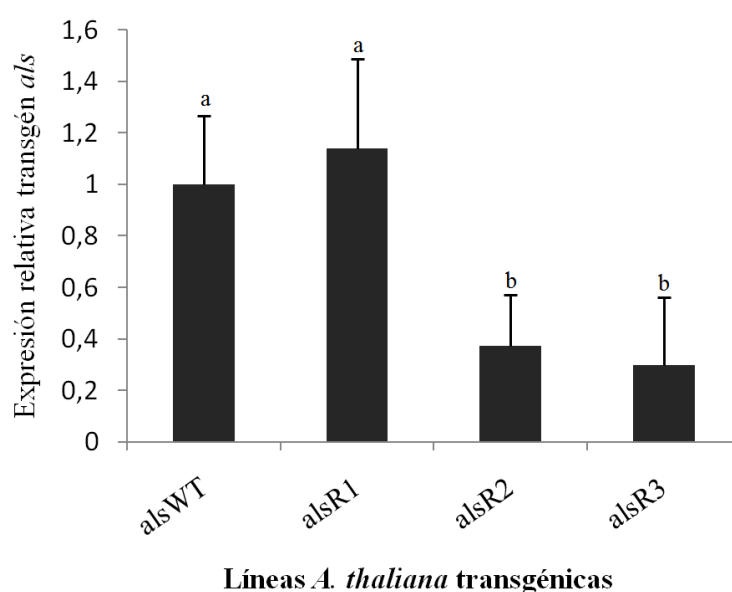


Figura 26. Expresión relativa del transgén *als* en las líneas de *A. thaliana* seleccionadas. Los niveles de expresión del transgén *als* fueron normalizados con los del gen de referencia *pd2f* y relativizados a aquellos del evento transformados con la versión alsWT. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas.

5.3.3.2 Niveles de resistencia

La generación T2 fue conducida hasta madurez de cosecha y la próxima generación (T3) fue sometida a diferentes ensayos de exposición a herbicidas. La corroboración de niveles de expresión similares entre las líneas alsWT y alsR1 fue tomada como punto de partida para validar que cualquier diferencia fenotípica entre ambas se deba a las mutaciones portadas por el alelo alsR.

En los ensayos de crecimiento en medios suplementados con herbicidas, se puede apreciar la rápida inhibición de la germinación y el crecimiento en plantas alsWT a concentraciones 0,1 μ M de imazetapir, mientras que las correspondientes al evento alsR1

muestran un crecimiento normal hasta concentraciones 1 μM de imazetapir (Figura 27A). Sin embargo, no se aprecia un efecto diferencial en la germinación y el crecimiento de las plantas alsWT y alsR1 en presencia de concentraciones crecientes de los otros dos herbicidas, clorimurón-etil y diclosulam (Figura 27A). Cabe destacar que las plantas Col0 presentaron una inhibición total del crecimiento a las concentraciones de herbicidas más bajas (no mostrado).

En lo que respecta a los análisis de actividad ALS *in vitro* en presencia de los inhibidores, puede observarse un aumento del 52% y del 82% en la resistencia a imazetapir 50 μM en plantas alsR1 respecto de las plantas transgénicas alsWT y Col0, respectivamente (Figura 27B). No se observaron diferencias en la sensibilidad de los extractos enzimáticos a clorimurón-etil ni a diclosulam. Sin embargo, no puede descartarse que las concentraciones testeadas hayan sido demasiado elevadas y que concentraciones menores permitan observar diferencias en la sensibilidad.

Por su parte, el ensayo dosis-respuesta por riego con herbicidas indica que no hay diferencias significativas entre el crecimiento de plantas alsR1, alsWT y Col0 para ninguno de los tratamientos (Figura 28).

Estos resultados en su conjunto sugieren que el transgén alsR (282+574) no estaría aportando ningún nivel de resistencia a los herbicidas clorimurón-etil (sulfonilurea) y diclosulam (triazolopirimidina). Si bien algunos de los ensayos indican un cierto grado de resistencia a imazetapir, el fenotipo observado no confirma la hipótesis planteada.

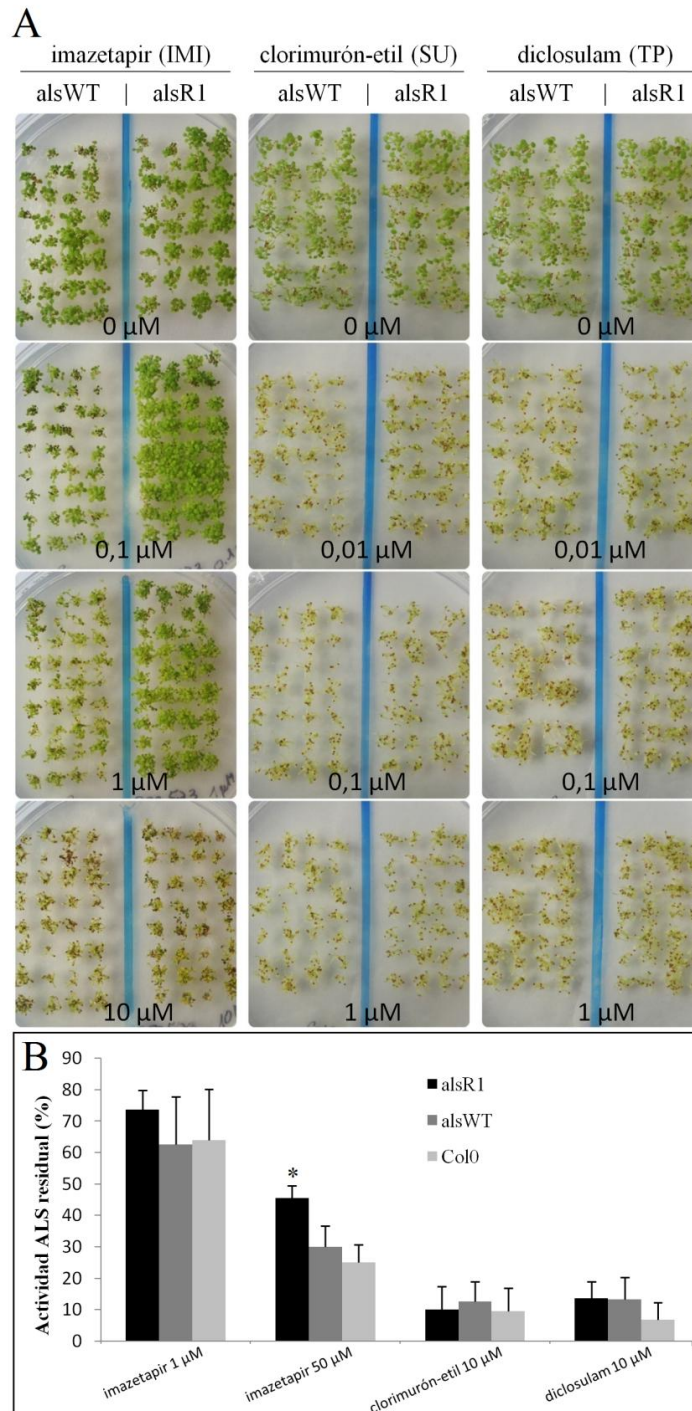


Figura 27. Resistencia a inhibidores de la ALS en las líneas transgénicas. A: Ensayos de crecimiento de *A. thaliana* en medios MS suplementados distintas concentraciones de tres herbicidas inhibidores de la ALS. B: Actividad de la enzima ALS en presencia de dos concentraciones de imazetapir, 10 μ M de clorimurón-etil y 10 μ M de diclosulam, por separado. Los valores se expresan como % de actividad residual respecto del control no tratado. * Indica diferencias estadísticamente significativas dentro de cada tratamiento.

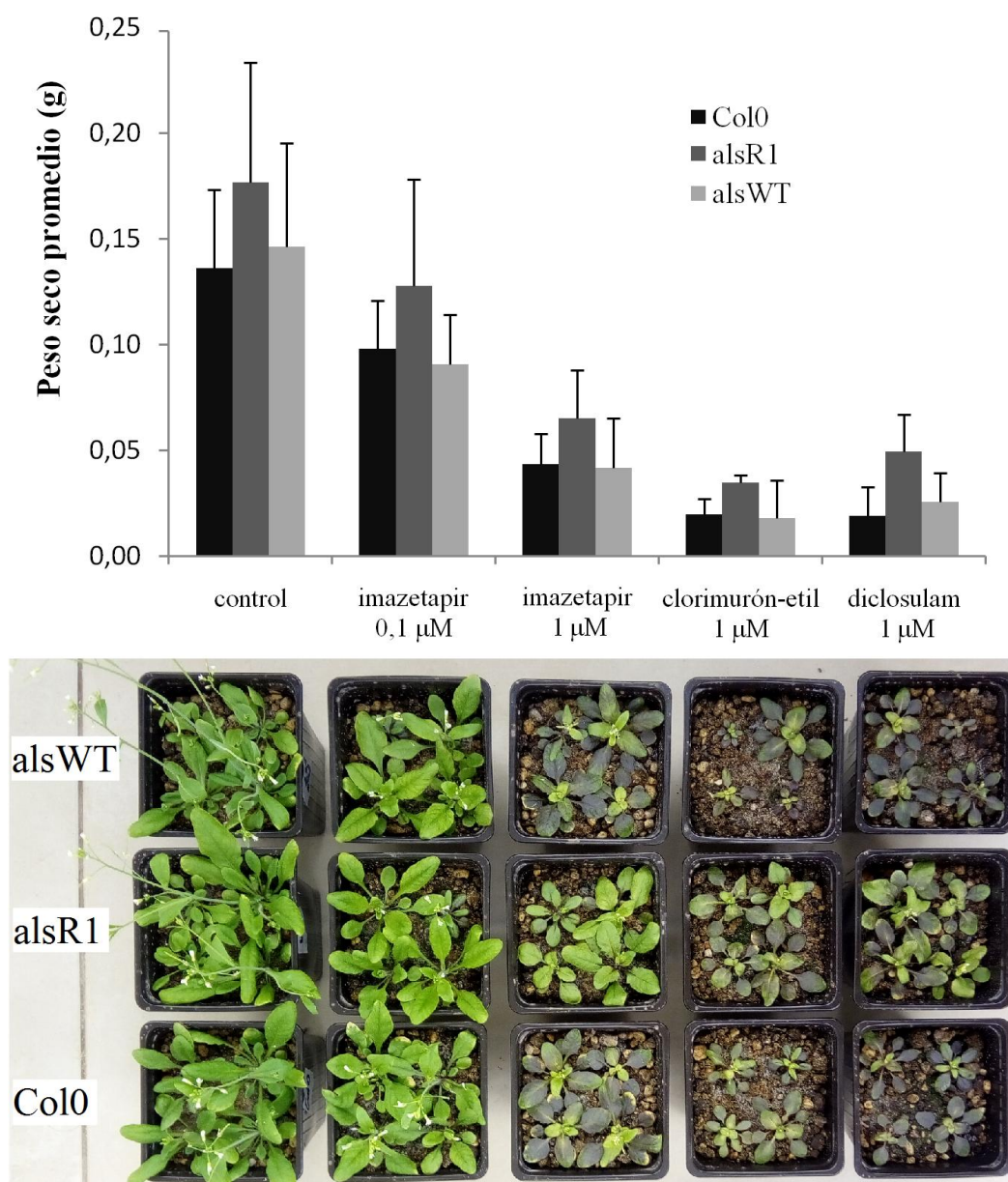


Figura 28. Ensayo dosis-respuesta por riego con herbicidas. Grupos de plantas transgénicas y no transgénicas fueron regadas de manera continua con distintos herbicidas. Al cabo de seis semanas, se registró su crecimiento (imagen inferior), y el peso seco promedio para cada grupo dentro de cada tratamiento (imagen superior).

5.3.4 Construcción de vectores pMF6als para expresión en trigo

La estrategia de subclonado utilizada permitió la construcción de tres vectores de expresión conteniendo las variantes alélicas alsWT (control), als574 (sustitución W574L que otorga resistencia cruzada a las cinco familias de inhibidores de la ALS) y als282 (sustitución A282D, con efectos desconocidos en la resistencia). Se desestimó la construcción de un vector portando la versión alélica alsR (282+574) debido a que los ensayos en *A. thaliana* indicaron la ausencia de un fenotipo significativamente resistente a inhibidores de la ALS.

Como se observa en la Figura 29B, la digestión de los plásmidos recombinantes contruidos y purificados produce un patrón coincidente con lo esperado: una banda de 2000 pb correspondiente al gen *als* (Figura 29, fragmento azul) y una banda de 4000 pb correspondiente al resto del vector. El patrón de digestión arrojado para el vector de origen (pGEM-Tals) es visiblemente diferente y nos permite descartar posibles contaminaciones. La identidad nucleotídica del vector y de cada una de las versiones subclonadas fue corroborada exitosamente por secuenciación.

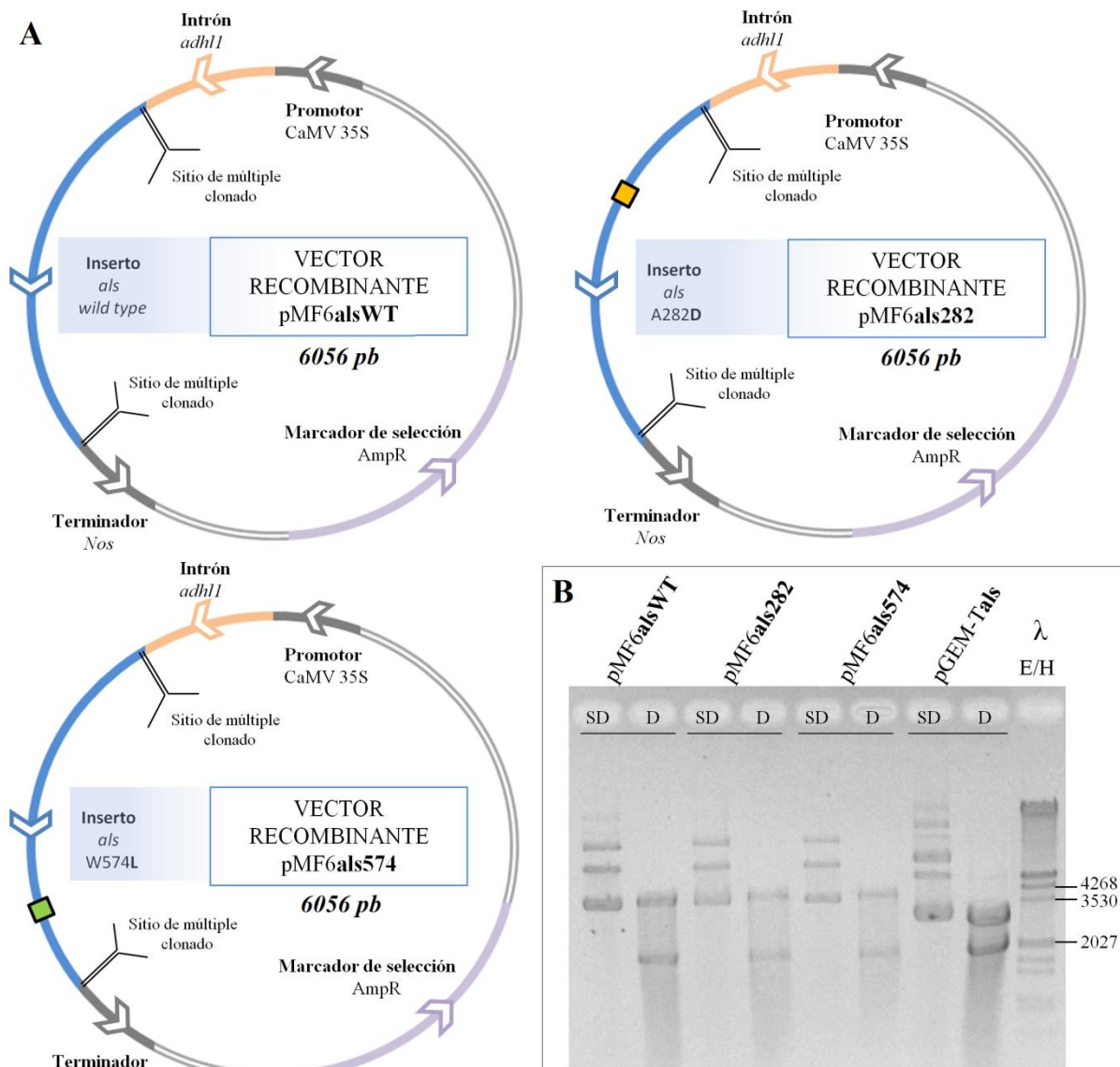


Figura 29. Construcción de vectores pMF6als. A: Esquema de los vectores construidos. B: Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de digestión de los vectores, lo cual corrobora la identidad de los mismos. SD: Sin digerir; D: Digerido.

5.3.5 Construcción de curvas de selección con imazetapir en cultivo *in vitro* de trigo

La formulación de los medios para el cultivo *in vitro* de los embriones de trigo Klein Brujo fue exitosa. Como puede observarse en la Figura 30, se pudo completar el proceso de embriogénesis somática y producir plantas de trigo regeneradas en condiciones *in vitro*.

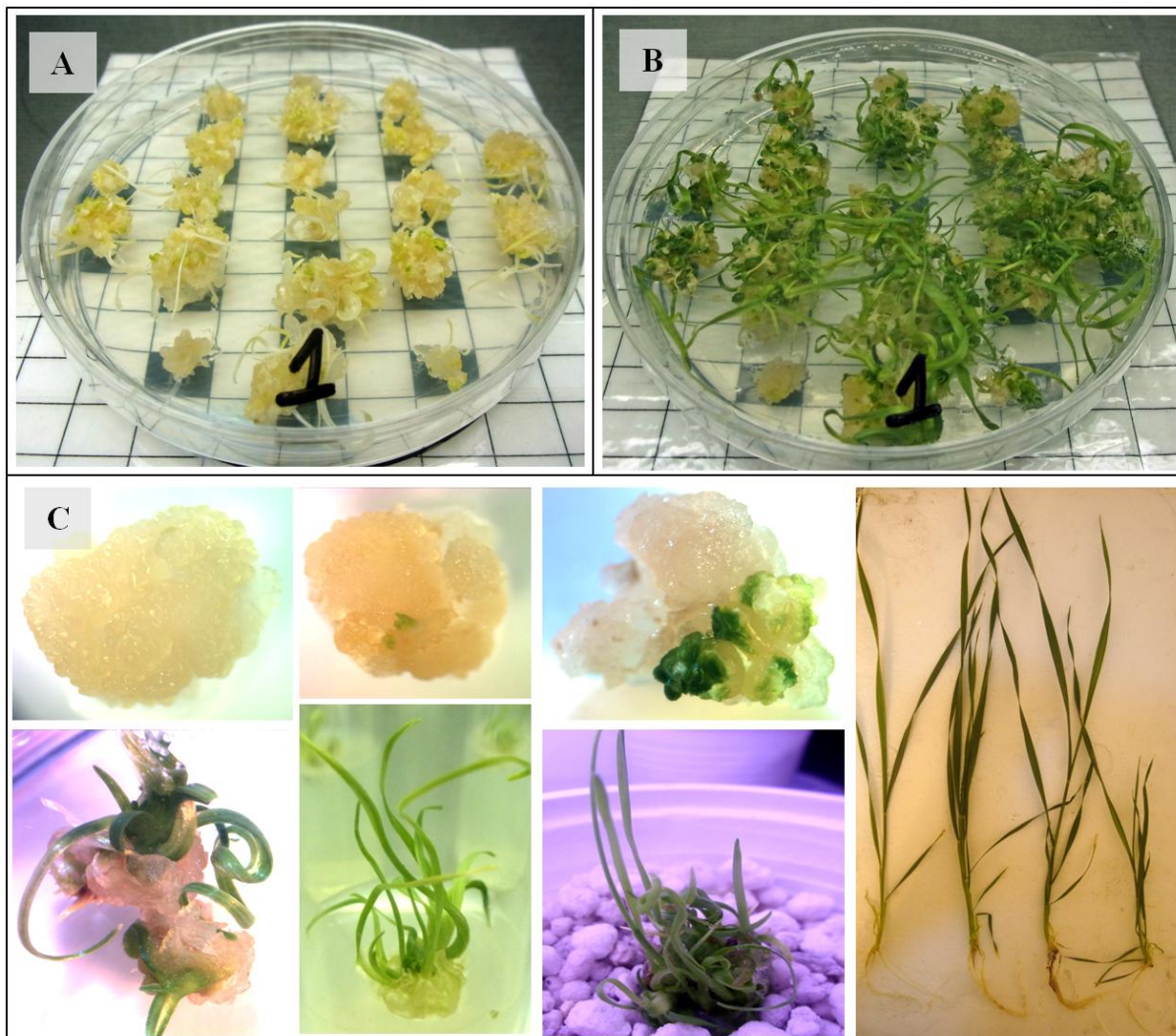


Figura 30. Cultivo *in vitro* de trigo. Embriones en etapas de inducción (A) y regeneración (B) en medios no selectivos. C: Registro de las etapas de la regeneración de plantas de trigo por embriogénesis somática a partir de embriones crecidos en medios no selectivos.

Como resultado del crecimiento de los individuos en los medios selectivos ensayados, se pudo observar que una concentración de 1 μM de imazetapir produjo una reducción drástica del porcentaje de regeneración de callos (del 100% en los controles a un 3,33%), mientras que no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de inducción (valor- $p > 0,05$), los cuales superaron el 88% en todos los tratamientos (Tabla 17). Así, se pudo determinar que una concentración equivalente a 1 μM de imazetapir durante la etapa de regeneración permitiría seleccionar diferencialmente aquellos explantos expresando el transgén *als*. Cabe destacar que sólo aquellos callos clasificados con puntajes de 4 y 5 (Figura

31) fueron tomados en cuenta para el cálculo de los % de inducción y regeneración (Tabla 17), debido a su mayor posibilidad de éxito en la generación de nuevos individuos.

Tabla 17. Registro de los niveles de inducción y regeneración de embriones de trigo Klein Brujo creciendo en medios de cultivo suplementados con imazetapir 1, 2 y 5 μ M (Imi 1, 2 y 5, respectivamente). Los callos clasificados con los puntajes 4 y 5 fueron considerados para los cálculos de % inducción y % regeneración.

	N° rep.	N° Embriones	Niveles inducción					Niveles regeneración					% Ind.	% Reg.
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
Control	3	51					51					51	100	100
Imi 1	3	60		3	9	23	25	19	30	9	2		100	3,3
Imi 2	3	58	7		18	20	13	24	25	8		1	88	1,96
Imi 5	3	60	1		21	21	17	13	41	5			98	0

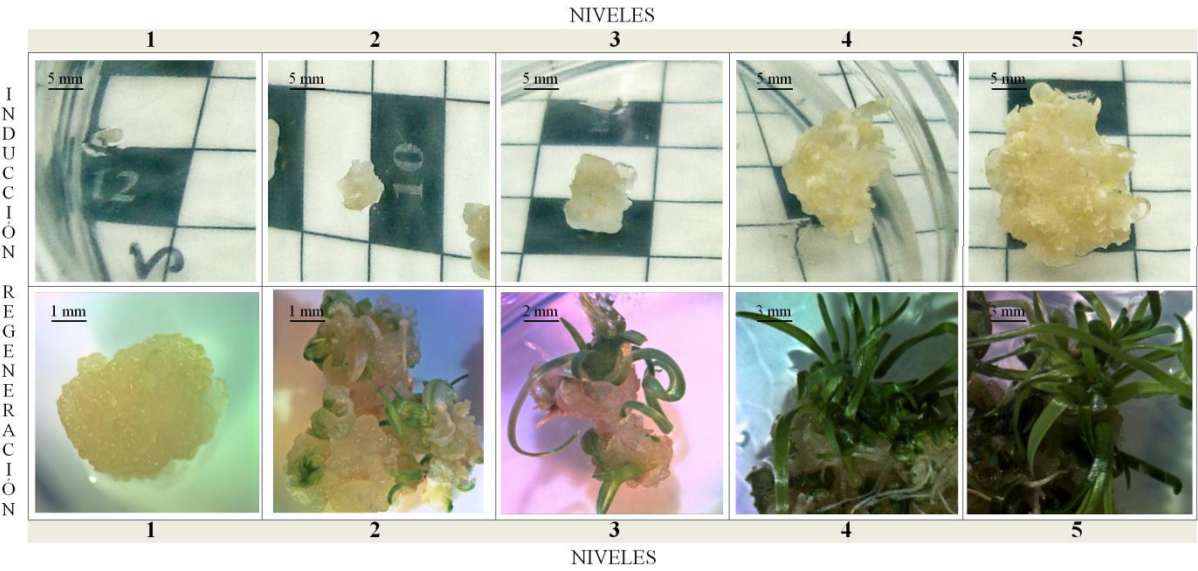


Figura 31. Escala de clasificación de los callos en las etapas de inducción y regeneración. Un puntaje de 1 implicó ausencia de callos o partes verdes respectivamente. Puntajes de 2, 3 y 4 cantidades sucesivamente mayores. Un puntaje de 5, indicó el mismo nivel de inducción o regeneración que los explantos de los controles crecidos en medios no selectivos.

De esta manera, pudieron optimizarse los medios y las condiciones de cultivo para los experimentos de transformación y selección de plantas de trigo transgénicas.

5.3.6 Selección de callos transgénicos de trigo

Una vez determinada la concentración del agente selectivo a utilizar en los experimentos de transformación, una serie de disparos con el acelerador de micropartículas fueron efectuados con el objetivo de introducir en trigo las versiones pMF6als construidas en

la sección 5.3.4 y corroborar la posibilidad de utilizar un gen *als* como marcador de selección. Así, los explantos fueron sometidos a un proceso de inducción de callos completo sin selección, y el agente de selección (imazetapir 1 μ M) fue adicionado en las etapas de regeneración.

Como puede observarse en la Figura 32, todos los explantos sufrieron un proceso de inducción normal y similar, independientemente de la versión del vector con la que se bombardearon. Durante la etapa de regeneración, en cambio, sólo algunos callos correspondientes a los disparos con el plásmido pMF6als574 presentaron un desarrollo aumentado (Figura 32, señalado con flecha roja). En ninguna de las instancias de transformación se observó un crecimiento sustancialmente mayor al de los controles de selección en los callos bombardeados con las versiones pMF6alsWT y pMF6als282.

Los callos que sobrevivieron al agente de selección continuaron su desarrollo y fueron transferidos a medios de regeneración con mayor altura, a medios de rusticación y a maceta, consecutivamente. A partir del tejido foliar de los mismos se pudo chequear la incorporación del transgén. Como se puede observar en la Figura 33, 4 de las 5 plántulas que completaron el proceso de regeneración resultaron positivas para la presencia del transgén, lo cual se evidenció por la amplificación específica de un fragmento de 670 pb. Se incluyeron controles positivos de amplificación y controles negativos de amplificación endógena y de contaminación.

Resulta pertinente destacar que la concentración utilizada del agente de selección no permitió la aparición de un alto porcentaje de escapes, a diferencia de lo que observaron Ogawa et al. (2008) utilizando concentraciones similares del inhibidor de la ALS bispiribac. Esto podría deberse a mayores niveles de expresión de la versión *als* introducida en este trabajo por la utilización de un promotor fuerte y constitutivo (35S). Adicionalmente, la ausencia de plántulas resistentes para la construcción pMF6als282 podría interpretarse como una ausencia de correlación entre esta versión alélica y la resistencia a inhibidores de la ALS, al menos en una magnitud mensurable en las condiciones experimentales ensayadas.

Estos resultados indican que fue posible obtener plántulas transgénicas de trigo y que la construcción desarrollada puede utilizarse como un marcador de selección. Como perspectivas, resta estudiar la segregación del transgén en las generaciones siguientes y ensayar la posibilidad de realizar la selección de los callos con otros ingredientes activos para los

cuales se espera que la versión alélica *als574* confiera resistencia (familias de las SU, TP, PTB y SCT, según Beckie y Tardif, 2012).

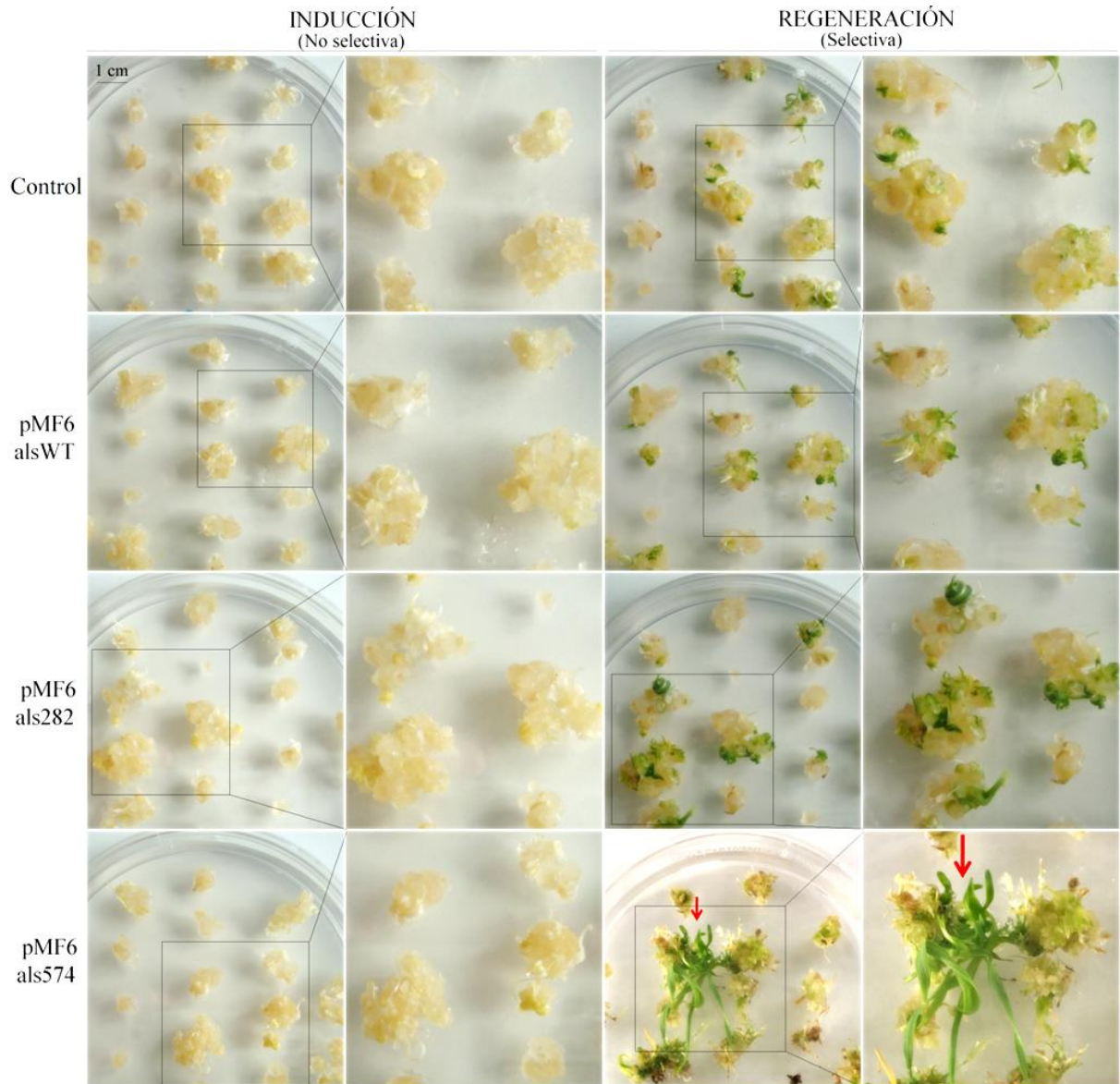


Figura 32. Embriogénesis somática a partir de callos de trigo bombardeados con las distintas versiones alélicas del gen *als* subclonado en el vector pMF6. Las fotografías fueron tomadas cuatro semanas de comenzados los procesos de inducción (no selectivo) y regeneración (selectivo).

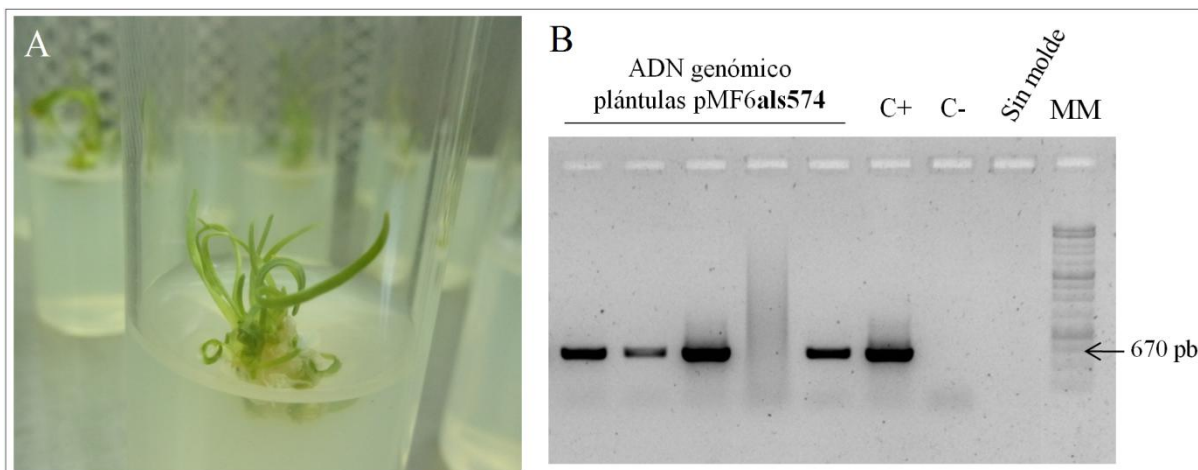


Figura 33. Confirmación de la transgénesis. A: Plántulas de trigo seleccionadas creciendo en altura en medios de regeneración suplementados con imazetapir 1 μ M. B: Chequeo de incorporación del trangén por amplificación de un fragmento *als* de 670 pb. C+: control positivo de amplificación con el vector pMF6als574. C-: Muestra de ADN genómico de plántulas de trigo de los controles de regeneración.

5.4 CONCLUSIONES

Por un lado, los ensayos sobre la línea de *A. thaliana* alsR1 (A282D + W574L) permitieron descartar la asociación de este alelo a un fenotipo de resistencia significativa a inhibidores de la ALS. Por el otro lado, los experimentos de transformación de trigo permiten hipotetizar que la versión als282 tampoco tiene una incidencia significativa en la resistencia, al menos al herbicida imazetapir. Y por último, los resultados aquí descritos demuestran que el gen *als* identificado, aislado y clonado durante el desarrollo de esta tesis puede utilizarse como herramienta biotecnológica (marcador de selección) en un proceso de transformación genética de trigo, confirmando la hipótesis planteada en la sección 5.1. Resta confirmar si la selección de callos transformantes puede efectivamente realizarse con otros principios activos para los cuales el gen selector otorga resistencia.

6. DISCUSIÓN GENERAL

A partir del presente proyecto de tesis doctoral, fue posible develar las bases moleculares de la resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS y a glifosato en dos de las especies latifoliadas más problemáticas de los últimos tiempos, *Amaranthus hybridus* y *Amaranthus palmeri*. En ambos casos, los estudios revelaron la presencia de mutaciones en el sitio de acción, causantes de sustituciones que modifican la estructura primaria y, consecuentemente, la conformación tridimensional de la proteína, haciendo que la misma se vuelva insensible a la acción de los herbicidas ensayados.

Además de contribuir a una mayor comprensión de los fenotipos de resistencia observados y de su distribución en Argentina, se pudo publicar por primera vez la secuencia completa del gen *als* para *A. hybridus* y se pudieron reportar algunos polimorfismos en el gen *als* nunca antes detectados, abriendo la puerta para futuros estudios moleculares sobre su implicancia en la resistencia.

Como se discutió en la introducción general, la caracterización de los mecanismos de resistencia resulta clave para la toma de decisiones acerca de las estrategias que se incluyen en un programa de manejo. En este sentido, a la luz de la presencia de sustituciones que confieren resistencia de amplio espectro a inhibidores de la ALS y de un emergente mecanismo de amplificación del gen *epsps*, podría alertarse sobre la ineficacia del control de estas especies de *Amaranthus* sólo con herbicidas de los grupos B y G en Argentina. Consecuentemente, estrategias que impliquen la rotación de mezclas de herbicidas con diferentes modos de acción en complementación con prácticas de control no químicas, podrían ser específicamente diseñadas para cada región bajo el soporte de estudios basados en evidencia científica.

Por otro lado, identificar y entender los mecanismos habilita a la creación de marcadores moleculares específicos para su detección, como el ensayo de HRMA aquí desarrollado para la detección de una nueva sustitución triple en la EPSPS. Si un mecanismo de resistencia es encontrado en una alta frecuencia en una región, la simple detección de este mecanismo en ausencia de un fenotipado tradicional (usualmente mucho más lento) podría aproximar fielmente los niveles de resistencia a una determinado herbicida.

El curso de estas investigaciones lleva, inevitablemente, a empujar los límites de lo conocido para adentrarse en nuevos mecanismos, conceptos y teorías. A medida que nuevos

alelos de resistencia son identificados y caracterizados, la fidelidad de la cuantificación de la resistencia mediante mecanismos moleculares se acerca cada vez más al fenotipado tradicional. Las encuestas, censos y relevamientos proveen de una oportunidad única no sólo para cuantificar la resistencia campo a campo en extensas regiones, sino también para incrementar el conocimiento acerca de cómo la resistencia a herbicidas evoluciona a lo largo de los años. Mantener la separación entre campos con resistencia y con susceptibilidad, por ejemplo, permitiría mayores opciones de control en un enfoque campo a campo. Este tipo de decisiones de manejo podría limitar la dispersión de la resistencia.

Adicionalmente, los estudios a gran escala permiten identificar aquellas poblaciones en las que nuevos mecanismos han aparecido en una frecuencia a la cual la caracterización ya es necesaria. Como se observó en el estudio de la resistencia a glifosato, lactofen y atrazina en *A. tuberculatus*, existen zonas grises en el conocimiento de los mecanismos de resistencia.

El entendimiento de cómo evoluciona la resistencia a herbicidas en malezas es el punto de partida para generar estrategias preventivas o proactivas. Sin embargo, estar preparados para nuevas situaciones problemáticas, ya sea por la introducción de especies no nativas o por la emergencia de resistencia a nuevos modos de acción, representa una capacidad con un alto potencial para la búsqueda de soluciones eficaces y sostenibles.

7. CONCLUSIONES GENERALES

CAPÍTULO 1

- Se confirmó la resistencia cruzada y múltiple en una población (R) de *Amaranthus palmeri* a tres familias químicas de herbicidas inhibidores de la ALS y a glifosato.
- Se confirmó la resistencia a glifosato en otra población (r) de *Amaranthus palmeri*.
- Se describieron, por primera vez para poblaciones de *A. palmeri* de Argentina, los mecanismos moleculares causantes de la resistencia a herbicidas con estos modos de acción.
- Para el caso de la población R, se detectó la sustitución W574L en la ALS como mecanismo de resistencia asociado al sitio de acción. Además, se reportó una alta prevalencia de la sustitución P106S en la EPSPS y una leve amplificación génica en el gen *epsps* como mecanismos de resistencia a glifosato.
- Las plantas de la población r presentaron sólo la sustitución P106S en la EPSPS, lo cual podría explicar los niveles de resistencia a glifosato más bajos respecto de la población R.
- No es posible descartar la presencia de mecanismos no asociados al sitio de acción contribuyendo en alguna medida a los fenotipos de resistencia observados.

CAPÍTULO 2

- Los resultados de este capítulo representan el primer reporte oficial sobre los mecanismos moleculares causantes de resistencia cruzada a inhibidores de la ALS en la especie de maleza más problemática de Argentina durante las últimas décadas, *Amaranthus hybridus*.

-
- Se describió la presencia de las sustituciones D376E y W574L en la ALS de cinco poblaciones de *A. hybridus* de la región pampeana como mecanismos asociados al sitio de acción causantes de la resistencia cruzada.
 - En lo que respecta al glifosato, la población R-CA presentó valores de resistencia extraordinariamente elevados comparados a aquellos de todas las otras poblaciones alguna vez descriptas.
 - Se asoció el fenotipo de resistencia a glifosato a un mecanismo nunca antes reportado, asociado a una triple sustitución aminoacídica en la EPSPS. Este mecanismo nuevo se denominó TAP-IVS y fue detectado como único mecanismo en la población R-CA.
 - Se desarrollaron técnicas, como el ensayo HRMA y la extracción de ADN de semilla única, que posibilitan la rápida detección de este nuevo mecanismo de resistencia en un alto número de individuos en simultáneo.
 - Los estudios realizados representan el primer reporte de mecanismos de resistencia a glifosato asociados al sitio de acción en *A. hybridus* en todo el mundo.

CAPÍTULO 3

- La resistencia a glifosato en *Amaranthus tuberculatus* está tan extendida en los cultivos de soja del estado de Ohio (EEUU) como lo está en otros estados. A su vez, el principal mecanismo de resistencia a este herbicida parece ser la amplificación del gen *epsps*, aunque es posible que otros mecanismos desconocidos estén presentes.
- Por el otro lado, la resistencia a herbicidas inhibidores de la PPO resultó poco frecuente, aunque concentrada en unas pocas poblaciones. El único mecanismo de resistencia detectado correspondió a una delección en la G210 del gen blanco.

-
- Por último, la resistencia a atrazina se observó en muy baja frecuencia pero en casi todas las poblaciones ensayadas, lo cual podría indicar que este herbicida se utiliza como último recurso y podría comenzar a fallar en un futuro cercano.

CAPÍTULO 4

- Los ensayos sobre la línea transgénica de *A. thaliana* alsR1 (A282D + W574L) permitieron descartar la asociación de este alelo a un fenotipo de resistencia a inhibidores de la ALS.
- Los ensayos de transformación de trigo indicarían que la versión als282 tampoco tiene una incidencia significativa en la resistencia, al menos al herbicida imazetapir.
- Los resultados descritos en este capítulo demuestran que un gen *als* identificado, aislado y clonado durante el desarrollo de la presente tesis puede utilizarse como herramienta biotecnológica (marcador de selección) en un proceso de transformación genética de trigo.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón-Reverte R, García A, Urzúa J, Fischer AJ (2013) Resistance to glyphosate in junglerice (*Echinochloa colona*) from California. *Weed Sci* 61:48–54.
- Alarcón-Reverte R, García A, Watson SB et al. (2015) Concerted action of target-site mutations and high EPSPS activity in glyphosate-resistant junglerice (*Echinochloa colona*) from California. *Pest Manag Sci* 71:996–1007.
- Alcántara-de la Cruz R, Fernández-Moreno PT, Ozuna CV et al. (2016a) Target and non-target site mechanisms developed by glyphosate-resistant hairy beggarticks (*Bidens pilosa* L.) populations from Mexico. *Front Plant Sci* 7:1492.
- Alcántara-de la Cruz R, Rojano-Delgado AM, Giménez MJ et al. (2016b) First resistance mechanisms characterization in glyphosate-resistant *Leptochloa virgata*. *Front Plant Sci* 7:1742.
- Amrhein N, Deus B, Gehrke P, Steinrücken H (1980) The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiol* 66:830–834.
- Anderson KS, Johnson KA (1990) Kinetic and structural analysis of enzyme intermediates: lessons from EPSP synthase. *Chem Rev* 90:1131–1149.
- Anderson MP, Gronwald JW (1991) Atrazine resistance in a velvetleaf (*Abutilon-theophrasti*) biotype due to enhanced glutathione-S-transferase activity. *Plant Physiol* 96:104–9.
- Anderson WP (1996) *Weed science: principles and applications*. Third edition. West Pub. Co. (Ed.). St. Paul. 388p.
- Anderson DD, Roeth FW, Martin AR (1996) Occurrence and control of triazine-resistant common waterhemp (*Amaranthus rudis*) in field corn (*Zea mays*). *Weed Technol* 10:570–575.
- Arnaud L, Sailland A, Lebrun M et al. (1998) Physiological behavior of two tobacco lines expressing EPSP synthase resistant to glyphosate. *Pestic Biochem Physiol* 62:27–39.
- Arregui MC, Puricelli E (2008) *Mecanismos de Acción de Plaguicidas*. Dow Agrosciences, 208p.
- Baerson SR, Rodríguez DJ, Tran M et al. (2002) Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiol* 129:1265–1275.

-
- Barrantes-Santamaría W, Castillo-Matamoros R, Herrera-Murillo F et al. (2018) Detection of the Trp-2027-Cys mutation in fluazifop-p-butyl-resistant itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis*) using high-resolution melting analysis (HRMA). *Weed Sci* 66:286–292.
- Bartholomew DM, Van dyk DE, Lau SMC et al. (2002) Alternate energy-dependent pathways for the vacuolar uptake of glucose and glutathione conjugates. *Plant Physiol* 130: 1562–1572.
- Bascomb NF, Gutteridge S, Smith JK, Leto KJ (1987) Import of in vitro synthesized acetolactate synthase into isolated pea-chloroplasts. *J Cell Biochem*, pp. 88-88.
- Bastida F, Menéndez J (2001) Producción integrada y manejo integrado de malas hierbas. *Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI*, pp:307–316.
- Baylis A (2000) Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Manag Sci* 56:299–308.
- Beale SI, Weinstein JD (1990) Tetrapyrrole metabolism in photosynthetic organisms. *Biosynthesis of Heme and Chlorophylls*, pp:287–391.
- Beckie HJ, Tardif FJ (2012) Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Prot* 35:15–28.
- Bell MS, Hager AG, Tranel PJ (2013) Multiple resistance to herbicides from four site-of-action groups in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). *Weed Sci* 61:460–468.
- Bensch CN, Horak MJ, Peterson D (2003) Interference of redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*), Palmer amaranth (*A. palmeri*), and common waterhemp (*A. rudis*) in soybean. *Weed Sci* 51:37–43.
- Berger S, Madeira PT, Ferrell J et al. (2016) Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) identification and documentation of ALS-resistance in Argentina. *Weed Sci* 64:312–320.
- Bernasconi P, Woodworth AR, Rosen BA, Subramanian MV, Siehl DL (1995) A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. *J Biol Chem* 270:17381–17385.
- Bhalla PL (2006) Genetic engineering of wheat—current challenges and opportunities. *Trends Biotechnol* 24:305–311.
- Black CC, Chen TM, Brown RH (1969) Biochemical basis for plant competition. *Weed Sci* 17:338–344.
-

-
- Bongiovanni R, Lowenberg-DeBoer J (2004) Precision agriculture and sustainability. *Precis Agricul* 5:359–387.
- Boocock MR, Coggins JR (1983) Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. *FEBS Lett* 154:127–133.
- Bostamam Y, Malone JM, Dolman FC, Boutsalis P, Preston C (2012) Rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) populations containing a target site mutation in EPSPS and reduced glyphosate translocation are more resistant to glyphosate. *Weed Sci* 60:474–479.
- Busi R, Yu Q, Barrett-Lennard R, Powles SB (2008) Long distance pollen-mediated flow of herbicide resistance genes in *Lolium rigidum*. *Theor Appl Genet* 117:1281–1290.
- Busi R, Powles SB (2009) Evolution of glyphosate resistance in a *Lolium rigidum* population by glyphosate selection at sublethal doses. *Heredity* 103:318–325
- Busi R, Gaines TA, Powles SB (2017) Phorate can reverse P450 metabolism-based herbicide resistance in *Lolium rigidum*. *Pest Manag Sci* 73:410–417.
- Callis J, Fromm M, Walbot V (1987) Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev* 10:1183–1200.
- Cardina J, Herms CP, Doohan DJ (2002) Crop rotation and tillage system effects on weed seedbanks. *Weed Sci* 50:448–460.
- Clements D, Weise S, Swanton C (1994) Integrated weed management and weed species diversity. *Phytoprotection* 75:1–18.
- Cobb A, Reade J (2010) *Herbicides and plant physiology*. 2nd ed. Wiley-Blackwell. Singapore. 286p.
- Collavo A, Sattin M (2012) Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum* selected in Italian perennial crops: bioevaluation, management and molecular bases of target-site resistance. *Weed Res* 52:16–24.
- Cordeau S, Triolet M, Wayman S, Steinberg C, Guillemain JP (2016) Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. *Crop Prot* 87:44–49.
- Costea M, Sanders A, Wainess G (2001) Preliminary results toward a revision of the *Amaranthus hybridus* species complex (*Amaranthaceae*). *SIDA Contrib Bot*, pp:931–974.
- Cromartie TH, Polge ND (2000) An improved assay for shikimic acid and its use as a monitor for the activity of sulfosate. *Proc Weed Sci Soc Am* 40:291.
-

-
- Culpepper AS, Grey TL, Vencill WK et al. (2006) Glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. *Weed Sci* 54:620–626.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi M, Scheible W (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139:5–17.
- Chahal PS, Aulakh JS, Jugulam M, Jhala AJ (2015) Herbicide-Resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri* S. Wats.) in the United States—mechanisms of resistance, impact, and management. In *Herbicides, Agronomic Crops and Weed Biology*, InTech.
- Chang A, Duggleby R (1997) Expression, purification and characterization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *Biochem J* 327:161–169.
- Chatham LA, Wu C, Riggins WC et al. (2015) EPSPS gene amplification is present in the majority of glyphosate-resistant Illinois waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) populations. *Weed Technol* 29:48–55.
- Chen J, Huang H, Zhang C et al. (2015) Mutations and amplification of EPSPS gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*). *Planta* 242:859–868.
- Chen G, Xu H, Zhang T, Bai C, Dong L (2018) Fenoxaprop-P-ethyl resistance conferred by cytochrome P450s and target site mutation in *Alopecurus japonicus*. *Pest Manag Sci*. DOI: 10.1002/ps.4863
- Chow KS, Singh DP, Roper JM, Smith AG (1997) A single precursor protein for ferrochelatase-I from *Arabidopsis* is imported *in vitro* into both chloroplasts and mitochondria. *J Biol Chem* 272:27565–27571.
- Dayan FE, Weete JD, Duke SO, Hancock HG (1997) Soybean (*Glycine max*) cultivar differences in response to sulfentrazone. *Weed Sci* 45:634–641.
- Dayan FE, Daga PR, Duke SO et al. (2010) Biochemical and structural consequences of a glycine deletion in the α -8 helix of protoporphyrinogen oxidase. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1804:1548–1556.
- De Carvalho LB, Alves P, Gonzalez-Torralva F et al. (2012) Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. *J Agric Food Chem* 60:615–622.
- Délye C (2013) Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Manag Sci* 69:176–187.
-

-
- Délye C, Jasieniuk M, Le Corre V (2013) Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends Genet* 29:649–658.
- Délye C, Duhoux A, Pernin F, Riggins CW, Tranel PJ (2015) Molecular mechanisms of herbicide resistance. *Weed Sci* 63:91–115.
- Della-Cioppa G, Bauer SC, Klein BK et al. (1986) Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci* 83:6873–6877.
- Devine MD, Eberlein CV (1993) Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites. *Rev Toxicol* 1:159–186.
- Devine MD, Duke SO, Fedtke C (1993) Inhibition of amino acid metabolism. En *Physiology of Herbicide Action* pp:251–294. PTR Prentice Hall.
- Devine MD (2002) Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitors. En *herbicide classes in development* pp:103–113. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Dill G, Sammons D, Feng P et al. (2010) Glyphosate: discovery, development, applications and properties. En *Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management* pp:1–33. Willey & Sons, Nueva Jersey.
- Dominguez-Valenzuela JA, Gherekhloo J, Fernández-Moreno PT et al. (2017) First confirmation and characterization of target and non-target site resistance to glyphosate in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) from Mexico. *Plant Physiol Biochem* 115:212–218.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
- Duggleby RG, McCourt JA, Guddat LW (2008) Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol Biochem* 46:309–324.
- Duke SO, Lydon J, Becerril J et al. (1991) Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Weed Sci* 39:465–473.
- Duke SO, Powles SB (2009) Glyphosate-resistant crops and weeds: now and in the future. *AgBioForum* 12:346–357.
- Duke SO, Dayan F (2011) Bioactivity of herbicides. En Moo-Young M (ed.) *Comprehensive biotechnology* pp:23–35. Vol IV. Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands.
- Durner J, Gailus V, Böger P (1991) New aspects on inhibition of plant acetolactate synthase by chlorsulfuron and imazaquin. *Plant Physiol* 95:1144–1149.

-
- Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr Sec D Biol Crystallogr* 60:2126–2132.
- Esvelt KM, Smidler AL, Catteruccia F, Church GM (2014) Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *Elife* 3, e03401.
- Falk JS, Shoup DE, Al-Khatib K, Peterson DE (2005) Survey of common waterhemp (*Amaranthus rudis*) response to protox- and ALS-inhibiting herbicides in northeast Kansas. *Weed Technol* 19:838–846.
- Feng PCC, Tran M, Chiu T et al. (2004) Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Sci* 52:498–505.
- Ferguson GM, Hamill AS, Tardif FJ (2001) ALS inhibitor resistance in populations of Powell amaranth and redroot pigweed. *Weed Sci* 49:448–453.
- Figueiredo MR, Leibhart LJ, Reicher ZJ et al. (2018) Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid contributes to resistance in a common waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) population. *Pest Manag Sci* 74:2356–2362.
- Foes MJ, Liu L, Tranel PJ, Wax LM, Stoller EW (1998) A biotype of common waterhemp (*Amaranthus rudis*) resistant to triazine and ALS herbicides. *Weed Sci* 31:514–520.
- Forlani G, Nielsen E, Landi P, Tuberosa R (1991) Chlorsulfuron tolerance and acetolactate synthase activity in corn (*Zea mays* L.) inbred lines. *Weed Sci* 39:553–557.
- Franz JE, Mao MK, Sikorski JA (1997) Glyphosate: a unique global herbicide. American Chemical Society.
- Funke T, Yang Y, Han H et al. (2009) Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97→Ile and Pro101→Ser in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 284:9854–9860.
- Gaines TA (2009) Molecular genetics of glyphosate resistance in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri* L.). Tesis doctoral, Colorado State University, ProQuest Dissertations Publishing, 3374647.
- Gaines TA, Zhang W, Wang D et al. (2010) Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:1029–1034.
- Gaines TA, Wright AA, Molin WT et al. (2013) Identification of Genetic Elements Associated with EPSPS Gene Amplification. *PLoS ONE* 8:e65819.
-

-
- Garcia MD, Nouwens A, Lonhienne TG, Guddat LW (2017) Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families. PNAS 114: E1091–E1100.
- Gao X, Zhang L, Zhou S et al. (2011) AtMYB12 gene: a novel visible marker for wheat transformation. Mol Biol Rep 38:183–190.
- Ghanizadeh H, Harrington KC (2017) Non-target site mechanisms of resistance to herbicides. Crit Rev Plant Sci 36:24–34.
- Gherekhloo J, Fernández-Moreno PT, Alcántara-de la Cruz R et al. (2017) Pro-106-Ser mutation and EPSPS overexpression acting together simultaneously in glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica*). Sci Rep 7:6702.
- Giacomini DA, Umphres AM, Nie H et al. (2017) Two new PPX2 mutations associated with resistance to PPO-inhibiting herbicides in *Amaranthus palmeri*. Pest Manag Sci 73:1559–1563.
- Goggin DE, Cawthray GR, Powles SB (2016) 2,4-D resistance in wild radish: reduced herbicide translocation via inhibition of cellular transport. J Exp Bot 67:3223–3235.
- Goloubinoff P, Edelman M, Hallick RB (1984) Chloroplast-encoded atrazine resistance in *Solanum nigrum*: psbA loci from susceptible and resistant biotypes are isogenic except for a single codon change. Nucleic Acids Res 12:9489–9496.
- Gonzalez-Torralva F, Gil-Humanes J, Barro F, Brants I, De Prado R (2012a) Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype from Spain. Plant Physiol Biochem 58:16–22.
- González-Torralva F, Rojano-Delgado AM, De Castro MDL, Mülleder N, De Prado R (2012b) Two non-target mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes. J Plant Physiol 169:1673–1679.
- Grattieri M, Hasan K, Minter SD (2017) Bioelectrochemical systems as a multipurpose biosensing tool: Present perspective and future outlook. ChemElectroChem 4:834–842.
- Gressel J, Segel L (1978) The paucity of plants evolving genetic resistance to herbicides: possible reasons and implications. J Theor Biol 75: 349–371.
- Gressel J, Levy A (2006) Agriculture: the selector of improbable mutations. Proc Natl Acad Sci USA 103:12215–12216.
-

-
- Gronwald JW, Powles SB, Holtum JAM (1994). Resistance to photosystem II inhibiting herbicides. *Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry*. Boca Raton, FL: Lewis, pp:27–60.
- Gruys KJ, Sikorski JA (1999) Inhibitors of tryptophan, phenylalanine, and tyrosine biosynthesis as herbicides. *Plant Amino Acids*. Marcel Dekker Inc. New York, pp:357–384.
- Guttieri MJ, Eberlein CV, Mallory-Smith CA, Thill DC, Hoffman DL (1992) DNA sequence variation in Domain A of the acetolactate synthase genes of herbicide-resistant and -susceptible weed biotypes. *Weed Sci* 40:670–676.
- Hager AG, Wax LM, Stoller EW, Bollero GA (2002) Common waterhemp (*Amaranthus rudis*) interference in soybean. *Weed Sci*. 50:607–610.
- Hall L, Moss S, Powles SB (1997) Mechanisms of resistance to aryloxyphenoxypropionate herbicides in two resistant biotypes of *Alopecurus myosuroides* (blackgrass): herbicide metabolism as a cross-resistance mechanism. *Pest Biochem Physiol* 57:87–98.
- Han H, Vila-Aiub MM, Jalaludin A, Yu Q, Powles SB (2017). A double EPSPS gene mutation endowing glyphosate resistance shows a remarkably high resistance cost. *Plant Cell Environ* 40:3031–3042.
- Harker K, Clayton G (2004) Diversified weed management systems. En *Weed biology and management* pp:251–265. Inderjit (Ed.). Dordrecht. Kluwer Academic Publishers.
- Hawkins CF, Borges A, Perham RN (1989) A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. *FEBS Lett* 255:77–82.
- Heap I, Knight R (1986) The occurrence of herbicide cross-resistance in a population of annual ryegrass, *Lolium rigidum*, resistant to diclofop-methyl. *Crop Pasture Sci* 37:149–156.
- Heap I (2014) Herbicide resistant weeds. En *Integrated Pest Management* pp:21-301. Pimentel D, Peshin R (Ed.). Vol 3, Springer, Netherlands.
- Heap I (2019) The international survey of herbicide resistant weeds. <http://www.weedscience.org>. Último acceso feberero 2019.
- Herrmann KM, Weaver LM (1999) The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:473–503.
- Hirschberg J, McIntosh L (1983) Molecular basis of herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. *Science* 222:1346–1349.
-

-
- Holt J, Le Baron H (1990) Significance and distribution of herbicide resistance. *Weed Technol* 4:141–149.
- Huffman J, Hausman NE, Hager AG, Riechers DE, Tranel PJ (2015) Genetics and inheritance of nontarget-site resistances to atrazine and mesotrione in a waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) population from Illinois. *Weed Sci* 63:799–809.
- Hurley TM, Frisvold G (2016) Economic barriers to herbicide-resistance management. *Weed Sci* 64:585–594.
- ISAAA (2017) Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017: Biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 Years. ISAAA Brief 53, ISAAA. Ithaca, NY.
- Iwakami S, Uchino A, Kataoka Y et al (2014) Cytochrome P450 genes induced by bispyribac-sodium treatment in a multiple-herbicide-resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*. *Pest Manag Sci* 70:549–558.
- Jacobs JM, Jacobs NJ (1984). Protoporphyrinogen oxidation, an enzymatic step in heme and chlorophyll synthesis: partial characterization of the reaction in plant organelles and comparison with mammalian and bacterial systems. *Arch Biochem Biophys* 229:312–319.
- Jacobs JM, Jacobs NJ (1993) Porphyrin accumulation and export by isolated barley (*Hordeum vulgare*) plastids (effect of diphenyl ether herbicides). *Plant Physiol* 101:1181–1187.
- Jasieniuk M, Brûlé-Babel AL, Morrison IN (1996) The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. *Weed Sci* 44:176–193.
- Jasieniuk M, Ahmad R, Sherwood AM et al. (2008) Glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in California: distribution, response to glyphosate, and molecular evidence for an altered target enzyme. *Weed Sci* 56:496–502.
- Jauhar PP (2006) Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: the prospects and challenges. *Crop Sci* 46:1841–1849.
- Jha P, Norsworthy JK, Malik MS (2007) Effect of tillage and soybean canopy formation on temporal emergence of Palmer amaranth from a natural seed bank. *Proc South Weed Sci Soc* 60:11.
- Jones AV, Young RM, Leto KJ (1985) Subcellular localization and properties of acetolactate synthase, target site of the sulfonylurea herbicides. *Plant Physiol* 77:p. S293.
-

-
- Kaundun SS, Dale RP, Zelaya IA et al. (2011) A novel P106L mutation in EPSPS and an unknown mechanism(s) act additively to confer resistance to glyphosate in a South African *Lolium rigidum* population. *J Agric Food Chem* 59:3227–3233.
- Kaundun SS (2014) Resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides. *Pest Manag Sci* 70:1405–1417.
- Keeler SJ, Sanders P, Smith JK, Mazur BJ (1993) Regulation of tobacco acetolactate synthase gene expression. *Plant Physiol* 102:1009–1018.
- Kishore GM, Shah DM (1988) Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu Rev Biochem* 57:627–663.
- Koger CH, Reddy KN (2005) Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Sci* 53:84–89.
- Koo DH, Molin WT, Saski CA et al. (2018) Extrachromosomal circular DNA-based amplification and transmission of herbicide resistance in crop weed *Amaranthus palmeri*. *Proc Natl Acad Sci*. DOI:10.1073/pnas.1719354115.
- Labrada R, Caseley JC, Parker C (1994) Weed management for developing countries. Vol 120. Food & Agriculture Org.
- Laplante J, Rajcan I, Tardif FJ (2009) Multiple allelic forms of acetohydroxyacid synthase are responsible for herbicide resistance in *Setaria viridis*. *Theor Appl Genet* 119:577–585.
- Larran AS, Palmieri VE, Perotti VE, Lieber L, Tuesca D, Permingeat HR (2017) Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Amaranthus palmeri* from Argentina. *Pest Manag Sci* 73:2578–2484.
- Le Baron H, McFarland J (1990) Overview and prognosis of herbicide resistance in weeds and crops. En *Managing resistance to agro-chemicals: from fundamental research to practical strategies*. Green M, Le Baron H, Moberg W (Eds.) Washington, American Chemical Society.
- Lebrun M, Sailland A, Freyssinet G, Degryse E (2003) Mutated 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene. Bayer CropScience SA US Patent N° 6.566.587 pp:1–17.
- Lee RM, Hager AG, Tranel PJ (2008) Prevalence of a novel resistance mechanism to PPO-inhibiting herbicides in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). *Weed Sci* 56:371–75.

-
- Lee YT, Duggleby RG (2001) Identification of the regulatory subunit of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase and reconstitution with its catalytic subunit. *Biochemistry* 40:6836–6844.
- Lee YT, Duggleby RG (2002) Regulatory interactions in *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *FEBS Lett* 512:180–184.
- Lee HJ, Duke SO (1994) Protoporphyrinogen IX-oxidizing activities involved in the mode of action of peroxidizing herbicides. *J Agric Food Chem* 42:2610–2618.
- Legleiter TR, Bradley KW (2008) Glyphosate and multiple herbicide resistance in common waterhemp (*Amaranthus rudis*) populations from Missouri. *Weed Sci* 56:582–587.
- Letouzé A, Jacques G (2003) Enhanced activity of several herbicide-degrading enzymes: a suggested mechanism responsible for multiple resistance in blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.). *Agronomie* 23:601–608.
- Li J, Ye X, An B, Du L, Xu H (2012) Genetic transformation of wheat: current status and future prospects. *Plant Biotechnol Rep* 6:183–193.
- Li J, Peng Q, Han H, Nyporko A, Kulynych T, Yu Q, Powles S (2018) Glyphosate resistance in *Tridax procumbens* via a novel EPSPS Thr-102-Ser substitution. *J Agric Food Chem* 66:7880–7888.
- Li X, Volrath SL, Nicholl DB et al. (2003) Development of protoporphyrinogen oxidase as an efficient selection marker for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize. *Plant Physiol* 133:736–747.
- Lonhienne T, Garcia MD, Pierens G, Mobli M, Nouwens A, Guddat LW (2018) Structural insights into the mechanism of inhibition of AHAS by herbicides. *PNAS* 115:E1945–E1954.
- Lorraine-colwill DF, Powles SB, Hawkes TR et al. (2002) Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pest Biochem Physiol* 74:62–72.
- Lovell ST, Wax LM, Horak MJ, Peterson DE (1996) Imidazolinone and sulfonyleurea resistance in a biotype of common waterhemp (*Amaranthus rudis*). *Weed Sci*, pp:789–794.
- Lloret FJ (2016) Resistencia a herbicidas y manejo de yuyo colorado (*Amaranthus hybridus* L.) en la Región Centro y Sud-Este de Córdoba. Tesis de grado. Disponible en: www.rdu.unc.edu.ar/handle/11086/4848.
-

-
- Ma R, Kaundun SS, Tranel PJ et al. (2013) Distinct detoxification mechanisms confer resistance to mesotrione and atrazine in a population of waterhemp. *Plant Physiol* 163:363–377.
- Maertens KD, Sprague CL, Tranel PJ, Hines RA (2004) *Amaranthus hybridus* populations resistant to triazine and acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Weed Res* 44:21–26.
- Malone JM, Morran S, Shirley N, Boutsalis P, Preston C (2016) EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant *Bromus diandrus*. *Pest Manag Sci* 72:81–88.
- Mallory-Smith CA, Thill DC, Dial MJ (1990) Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technol*, pp:163–168.
- Manalil S, Busi R, Renton M, Powles SB (2011) Rapid evolution of herbicide resistance by low herbicide dosages. *Weed Sci* 59:210–217.
- Markus C, Pecinka A, Karan R, Barney JN, Merotto A (2017) Epigenetic regulation—contribution to herbicide resistance in weeds? *Pest Manag Sci* 74:275–281.
- Martínez-Crovetto R (1981) Las plantas utilizadas en medicina popular en el noroeste de Corrientes (República Argentina). Ministerio de Cultura y Educación, Fundación Miguel Lillo.
- Martinoia E, Grill E, Tommasini R, Kreuz K, Amrhein N (1993) ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364:247–249.
- Massa D, Krenz B, Gerhards R (2011) Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Apera spica-venti* populations is conferred by documented and previously unknown mutations. *Weed Res* 51:294–303.
- Mazur BJ, Chui CF, Smith JK (1987) Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. *Plant Physiol* 85:1110–1117.
- McCourt JA, Pang SS, Guddat LW, Duggleby RG (2005) Elucidating the specificity of binding of sulfonylurea herbicides to acetohydroxyacid synthase. *Biochemistry* 44:2330–2338.
- McCourt JA, Pang SS, King-Scott J, Guddat L, Duggleby RG (2006) Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *Proc Natl Acad USA* 103:569–573.
-

-
- McMullan PM, Green JM (2011) Identification of a tall waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) biotype resistant to HPPD-inhibiting herbicides, atrazine, and thifensulfuron in Iowa. *Weed Technol* 25:514–518.
- McNaughton KE, Letarte J, Lee EA, Tardif FJ (2005) Mutations in ALS confer herbicide resistance in redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and Powell amaranth (*Amaranthus powellii*). *Weed Sci* 53:17–22.
- Meagher TR, Belanger FC, Day PR (2003) Using empirical data to model transgene dispersal. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:1157–1162.
- Mei Y, Xu Y, Wang S, Qiu L, Zheng M (2018) Investigation of glyphosate resistance levels and target-site based resistance (TSR) mechanisms in *Conyza canadensis* (L.) from apple orchards around areas of Bohai seas and Loess Plateau in China. *Pest Biochem Physiol* 146:7–12.
- Mifflin BJ (1971) Cooperative feedback control of barley acetohydroxyacid synthetase by leucine, isoleucine, and valine. *Arch Biochem Biophys* 146:542–550.
- Mifflin BJ, Cave PR (1972) The control of leucine, isoleucine, and valine biosynthesis in a range of higher plants. *J Exp Bot* 23:511–516.
- Molin WT, Nandula VK, Wright AA, Bond JA (2016) Transfer and expression of ALS inhibitor resistance from Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) to an *A. spinosus* × *A. palmeri* hybrid. *Weed Sci* 64:240–247.
- Moretti ML, Van Horn CR, Robertson R et al. (2018) Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: Part 2. Rapid response physiology and non-target-site resistance. *Pest Manag Sci* 74:1079–1088.
- Morichetti S, Ferrell J (2010) *Amaranthus palmeri*, Palmer Amaranth. University of Florida, IFAS extension, SS-AGR-336:1–5.
- Morichetti S, Cantero JJ, Núñez C, Barboza GE, Amuchastegui A, Ferrell J (2013) On the presence of *Amaranthus palmeri* (*Amaranthaceae*) in Argentina. *Bol Soc Argent Bot* 48:347–353.
- Mousdale DM, Coggins JR (1993) Subcellular localization of the common shikimate-pathway enzymes in *Pisum sativum* L. *Planta* 163:241–249.
- Muller YA, Schulz GE (1993) Structure of the thiamine-and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science* 259:965–967.

-
- Nakka S, Thompson CR, Peterson DE, Jugulam M (2017) Target site-based and non-target site based resistance to ALS inhibitors in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). Weed Sci 65:681–689.
- Nandula VK (2010) Herbicide resistance: Definitions and concepts. Capítulo 2 en Glyphosate resistance in crops and weeds, Wiley, Hoboken.
- Nandula VK, Ray JD, Ribeiro DN, Pan Z, Reddy KN (2013) Glyphosate resistance in tall waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Mississippi is due to both altered target-site and nontarget-site mechanisms. Weed Sci 61:374–383.
- Nandula VK, Wright AA, Bond JA, Ray JD, Eubank TW, Molin WT (2014) EPSPS amplification in glyphosate-resistant spiny amaranth (*Amaranthus spinosus*): a case of gene transfer via interspecific hybridization from glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). Pest Manag Sci 70:1902–1909.
- Neve P, Diggle A, Smith F, Powles SB (2003) Simulating evolution of glyphosate resistance in *Lolium rigidum* I: population biology of a rare resistance trait. Weed Res 43:404–417.
- Ngo TD, Krishnan M, Boutsalis P, Gill G, Preston C (2018) Target-site mutations conferring resistance to glyphosate in feathertop Rhodes grass (*Chloris virgata*) populations in Australia. Pest Manag Sci 74:1094–1100.
- Nol N, Tsikou D, Eid M, Livieratos IC, Giannopolitis CN (2012) Shikimate leaf disc assay for early detection of glyphosate resistance in *Conyza canadensis* and relative transcript levels of EPSPS and ABC transporter genes. Weed Res 52:233–241.
- Norsworthy JK, Ward SM, Shaw DR et al. (2012) Reducing the risks of herbicide resistance: best management practices and recommendations. Weed Sci 60:31–62.
- Nuruzzaman MD, Rahman MM, Liu Y, Naidu R (2016) Nanoencapsulation, nano-guard for pesticides: A new window for safe application. J Agric Food Chem 64:1447–1483.
- Oettmeier W (1999) Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II. Cell Mol Life Sci 55:1255–1277.
- Ogawa T, Kawahigashi H, Toki S, Handa H (2008) Efficient transformation of wheat by using a mutated rice acetolactate synthase gene as a selectable marker. Plant Cell Rep 27:1325–1331.
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit, Bioinf 28:1166–1167.
-

-
- Okuzaki A, Shimizu T, Kaku K, Kawai K, Toriyama K (2007) A novel mutated acetolactate synthase gene conferring specific resistance to pyrimidinyl carboxy herbicides in rice. *Plant Mol Biol* 64:219–224.
- Oliveira MC, Gaines TA, Dayan FE et al. (2018) Reversing resistance to tembotrione in an *Amaranthus tuberculatus* (var. *rudis*) population from Nebraska, USA with cytochrome P450 inhibitors. *Pest Manag Sci* 74:2296–2305.
- Oliveira RS, Constantin J, Inoue MH (2011) *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas*. Omnipax (Ed.). Curitiba.
- Ortiz JPA, Reggiardo, MI, Ravizzini et al. (1996) Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation. *Plant Cell Rep* 15:877–881.
- Ouellet T, Rutledge RG, Miki BL (1992) Members of the acetohydroxyacid synthase multigene family of *Brassica napus* have divergent patterns of expression. *Plant J* 2:321–330.
- Owen MD (2016) Diverse approaches to herbicide-resistant weed management. *Weed Sci* 64:570–584.
- Page ER, Grainger CM, Laforest M et al. (2018) Target and non-target site mechanisms confer resistance to glyphosate in canadian accessions of *Conyza canadensis*. *Weed Sci* 66:234–245.
- Pan L, Gao HT, Xia WW, Zhang T, Dong LY (2016) Establishing a herbicide-metabolizing enzyme library in *Beckmannia syzigachne* to identify genes associated with metabolic resistance. *J Exp Bot* 67:1745–1757.
- Pannell DJ, Tillie P, Rodríguez-Cerezo E, Ervin D, Frisvold GB (2016) Herbicide resistance: Economic and environmental challenges. *AgBioForum* 19:136–155.
- Panozzo S, Scarabel L, Tranel PJ, Sattin M (2013) Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species *Echinochloa crus-galli*. *Pest Biochem Physiol* 105:93–101.
- Papa JC (2002) Malezas tolerantes y resistentes a herbicidas. *Actas del Seminario de Sustentabilidad de la Producción Agrícola*. INTA, JICA, Buenos Aires.
- Patzoldt WL, Hager AG, McCormick JS, Tranel PJ (2006) A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12329–12334.
- Patzoldt WL, Tranel PJ (2007) Multiple ALS mutations confer herbicide resistance in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). *Weed Sci* 55:421–428.
-

-
- Peng Y, Abercrombie LLG, Yuan JS et al. (2010) Characterization of the horseweed (*Conyza canadensis*) transcriptome using GS-FLX 454 pyrosequencing and its application for expression analysis of candidate non-target herbicide resistance genes. *Pest Manag Sci* 66:1053–1062.
- Pérez JJ (2005) Dimensión ética del desarrollo sostenible de la agricultura. *Rev Cienc Soc* 11:246–255.
- Perez-Jones A, Park KW, Polge N, Colquhoun J, Mallory-Smith CA (2007) Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta* 226:395–404.
- Permingeat HR, Alvarez ML, Cervigni GD, Ravizzini RA, Vallejos RH (2003). Stable wheat transformation obtained without selectable markers. *Plant Mol Biol* 52:415–419.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl Acid Res* 30:e36.
- Pognolote J, Bragachini M, Casini C, Gaido MB (2011) Siembra directa. Actualización Técnica N° 58. INTA, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Presidencia de la Nación.
- Pollegioni L, Schonbrunn E, Siehl D (2011) Molecular basis of glyphosate resistance—different approaches through protein engineering. *FEBS J* 278:2753–2766.
- Poston DH, Hirata CM, Wilson HP (2002) Response of acetolactate synthase from imidazolinone-susceptible and-resistant smooth pigweed to ALS inhibitors. *Weed Sci* 50:306–311.
- Powles SB (2008) Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Manag Sci* 64:360–365.
- Powles SB, Yu Q (2010) Evolution in action: Plants resistant to herbicides. *Annu Rev Plant Biol* 61:317–347.
- Preston C, Tardif FJ, Christopher JT, Powles SB (1996) Multiple resistance to dissimilar herbicide chemistries in a biotype of *Lolium rigidum* due to enhanced activity of several herbicide degrading enzymes. *Pest Biochem Physiol* 54:123–134.
- Preston C, Mallory-Smith CA (2001) Biochemical mechanisms, inheritance, and molecular genetics of herbicide resistance in weeds. En *Herbicide resistance and world grains* pp:24–49. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
-

-
- Preston C, Wakelin AM (2008) Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns. *Pest Manag Sci* 64:372–376.
- Puchta H (2000) Removal selectable marker genes: taking the shortcut. *Trends Plant Sci* 5: 273–274.
- Puchta H (2003) Marker-free transgenic plants. *Plant Cell Tissue Org Cult* 74:123–134.
- Radhakrishnan R, Alqarawi AA, Abd-Allah EF (2018) Bioherbicides: Current knowledge on weed control mechanism. *Ecotox Environ Safe* 158:131–138.
- Radosevich S, Holt J, Ghersa C (2007) Ecology of weeds and invasive plants: relationship to agriculture and natural resource management. Wiley & Sons, Nueva York.
- Rajguru SN, Burgos NR, Shivrain VK, Stewart JM (2005) Mutations in the red rice ALS gene associated with resistance to imazethapyr. *Weed Sci* 53:567–577.
- REM, 2019. Red de conocimiento de malezas resistentes. Disponible en: <https://www.aapresid.org.ar/rem>. Último acceso en febrero 2019.
- Riar DS, Norsworthy JK, Johnson DB, Scott RC, Bagavathiannan M (2011) Glyphosate resistance in a johnsongrass (*Sorghum halepense*) biotype from Arkansas. *Weed Sci* 59:299–304.
- Rosales-Robles ER, Sánchez de la Cruz R (2006) Clasificación y uso de los herbicidas por su modo de acción. INIFAP-Campo Experimental Río Bravo, Folleto técnico.
- Romagnoli MV, Tuesca D, Permingeat HR (2013) Characterization of *Amaranthus quitensis* resistance to three families of herbicides. *Ecol Austral* 23:119–125.
- Rutledge RG, Quellet T, Hattori J, Miki BL (1991) Molecular characterization and genetic origin of the *Brassica napus* acetohydroxyacid synthase multigene family. *Mol Gen Genet* MGG 229:31–40.
- Ryan GF (1970) Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Sci* 18:614–616.
- Saari LL, Cotterman JC, Thill DC (1994) Resistance to acetolactase synthase inhibiting herbicides. En *Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry* pp:83–139. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Sahrawat AK, Becker D, Lutticke S, Lorz H (2003) Genetic improvement of wheat via alien gene transfer, an assessment. *Plant Sci* 165:1147–1168.

-
- Salas RA, Dayan FE, Pan Z et al. (2012) EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) from Arkansas. *Pest Manag Sci* 68:1223–1230.
- Salas RA, Burgos NR, Tranel PJ et al. (2016) Resistance to PPO-inhibiting herbicide in Palmer amaranth from Arkansas. *Pest Manag Sci* 72:864–869.
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Third ed., Gold Spring Harbor, New York, pp:116–118.
- Sammons RD, Gaines TA (2014) Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Manag Sci* 70:1367–1377.
- Sarangi D, Sandell LD, Knezevic SZ et al. (2015) Confirmation and control of glyphosate-resistant common waterhemp (*Amaranthus rudis*) in Nebraska. *Weed Technol* 29:82–92.
- Sarangi D, Tyre AJ, Patterson EL et al. (2017) Pollen-mediated gene flow from glyphosate-resistant common waterhemp (*Amaranthus rudis* Sauer): consequences for the dispersal of resistance genes. *Sci Rep* 7:44913.
- Sardana V, Mahajan G, Jabran K, Chauhan BS (2017) Role of competition in managing weeds: An introduction to the special issue. *Crop Prot* 95:1–7.
- Sauer NJ, Mozoruk J, Miller RB et al. (2016) Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotechnol J* 14:496–50.
- Scursoni JA, Satorre EH (2010) Glyphosate management strategies, weed diversity and soybean yield in Argentina. *Crop Prot* 29:957–962.
- Schmitt GK, Singh BK (1990) Tissue distribution of acetohydroxyacid synthase activity at various developmental stages of lima bean. *Pest Sci* 30:418–419.
- Schonbeck V (2014) Weed Profile: Pigweeds (*Amaranthus* spp.). Virginia Association for Biological Farming, eXtension.
- Schönbrunn E, Eschenburg S, Shuttleworth WA et al. (2001) Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proc Natl Acad Sci* 98:1376–1380.
- Schultz JL, Chatham LA, Riggins CW, Tranel PJ, Bradley KW (2015) Distribution of herbicide resistances and molecular mechanisms conferring resistance in Missouri waterhemp (*Amaranthus rudis* Sauer) populations. *Weed Sci* 63:336–345.

-
- Senseman S (2007) Herbicide Handbook. Ed 9. Lawrence. Weed Science Society of America. 458pp.
- Shaner DL (1992) Herbicide resistance: Where are we? How did we get here? Where are we going? Weed Technol 9:850–856.
- Shaner DL (1999) Resistance to acetolactate synthase (ALS) inhibitors in the United States: history, occurrence, detection, and management. J Weed Sci Technol 44:405–411.
- Shaner DL, Nadler-Hassar T, Henry WB, Koger CH (2005) A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. Weed Sci 53:769–774.
- Shaner DL, Lindenmeyer RB, Ostlie MH (2012) What have the mechanisms of resistance to glyphosate taught us? Pest Manag Sci 68:3–9.
- Shaner DL (2014) Lessons learned from the history of herbicide resistance. Weed Sci 62:427–431.
- Shaner DL, Beckie HJ (2014) The future for weed control and technology. Pest Manag Sci 70:1329–1339.
- Shoup DE, Al-Khatib K, Peterson DE (2003) Common waterhemp (*Amaranthus rudis*) resistance to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. Weed Sci 51:145–150.
- Sibony M, Michel A, Haas HU, Rubin B, Hurle K (2001) Sulfometuron resistant *Amaranthus retroflexus*: cross-resistance and molecular basis for resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. Weed Res 41:509–522.
- Silvertown J, Charlesworth D (2001) Introduction to plant population biology. Oxford. Blackwell Science. 210pp.
- Smalla K, Borin S, Heuer H et al. (2000) Horizontal transfer of antibiotic resistance genes from transgenic plants to bacteria. En Proceedings of the Sixth International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms, pp:146–154.
- Smith AG, Marsh O, Elder GH (1993) Investigation of the subcellular location of the tetrapyrrole-biosynthesis enzyme coproporphyrinogen oxidase in higher plants. Biochem J 292:503–508.
- Soltys D, Krasuska U, Bogatek R, Gniazdowska A (2013) Allelochemicals as bioherbicides - present and perspectives. En Herbicides-Current research and case studies in use. Intech.
- Souza A, Ferreira F, Silva A, Cardoso A, Ruiz H (1999) Respiração microbiana do solo sob doses de glyphosate e de imazapyr. Planta Daninha 17:387–398.
-

-
- Spencer M, Mumm R, Gwyn J (2000) Glyphosate resistant maize lines. Dekalb Genetics Corporation. US Patent N° 6.040.497, pp:1–59.
- Sprankle P, Meggitt W, Penner D (1975) Adsorption, action and translocation of glyphosate. *Weed Sci* 23:235–240.
- Srivastava V, Ow DW (2004) Marker-free site-specific gene integration in plants. *Trends Biotechnol* 22:627–629.
- Stallings WC, Abdel-Meguid SS, Lim LW (1991) Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: a distinctive protein fold. *Proc Natl Acad Sci* 88:5046–5050.
- Steckel LE, Sprague CL (2004) Common waterhemp (*Amaranthus rudis*) interference in corn. *Weed Sci* 52:359–364.
- Steinrücken HC, Amrhein N (1980) The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 94:1207–1212.
- Steinrücken HC, Amrhein N (1984) 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumonia*. *Eur J Biochem* 143:341–349.
- Struik PC, Kuyper TW (2017) Sustainable intensification in agriculture: The richer shade of green. A review. *Agron Sustain Dev* 37:39.
- Subramanian MV, Hung HY, Dias JM et al. (1990) Properties of mutant acetolactate synthases resistant to triazolopyrimidine sulfonanilide. *Plant Physiol* 94:239–244.
- Swanton CJ, Clements D, Derksen D (1993) Weed succession under conservation tillage: A hierarchical framework for research and management. *Weed Technol* 7:286–297.
- Swanton CJ, Murphy S (1996) Weed science beyond the weeds: the role of integrated weed management (IWM) in agroecosystem health. *Weed Sci* 44:437–445.
- Swanton CJ, Nkoa R, Blackshaw RE (2015) Experimental methods for crop–weed competition studies. *Weed Sci* 63:2–11.
- Switzer CM (1957) The existence of 2,4-D-resistant strains of wild carrot. *Proceedings of the Northeastern Weed Control Conference* 11:315–318.
- Tani E, Chachalis D, Travlos IS (2015) A glyphosate resistance mechanism in *Conyza canadensis* involves synchronization of EPSPS and ABC-transporter genes. *Plant Mol Biol Rep* 33:1721–1730.
-

-
- Tardif FJ, Rajcan I, Costea M (2006) A mutation in the herbicide target site acetohydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powellii*. *New Phytol* 169:251–264.
- Torra J, Rojano-Delgado AM, Rey-Caballero J et al. (2017) Enhanced 2,4-D metabolism in two resistant *Papaver rhoeas* populations from Spain. *Front Plant Sci* 8:1584.
- Tranel PJ, Wassom J, Jeschke M, Rayburn A (2002) Transmission of herbicide resistance from a monoecious to a dioecious weedy *Amaranthus* species. *Theor Appl Genet* 105:674–679.
- Tranel PJ, Wright TR (2002) Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Sci* 50:700–712.
- Tranel PJ, Trucco F (2009) 21st-century weed science: a call for *Amaranthus* genomics. En Stewart CN Jr (Ed.) *Weedy and Invasive Plant Genomics*, pp:53–81. Ames, IA: Blackwell.
- Tranel PJ, Riggins CW, Bell MS, Hager AG (2011) Herbicide resistances in *Amaranthus tuberculatus*: a call for new options. *J Agric Food Chem* 59:5808–5812.
- Trigall Genetics, 2018. Disponible en: <http://www.trigall.com/?lang=es>. Último acceso en diciembre 2018.
- Trigo EJ (2011) Quince años de cultivos genéticamente modificados en la agricultura Argentina. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología, Buenos Aires.
- Trucco F, Jeschke MR, Rayburn AL, Tranel PJ (2005) Promiscuity in weedy amaranths: High frequency of female tall waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) x smooth pigweed (*A. hybridus*) hybridization under field conditions. *Weed Sci* 53:46–54.
- Trucco F, Hager AG, Tranel PJ (2006) Acetolactate synthase mutation conferring imidazolinone-specific herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. *J Plant Physiol* 163:475–479.
- Tsujii H, Dillon N, Ohkawa H (2004) Molecular functions of cytochrome P450 species involved in herbicide resistance in *Lolium rigidum* biotype WLR2. En *Int Symp Cytochrome P450: Biodiversity and Biotechnology*, Hyogo, Japan, pp:69.
- Tuesca D, Nisensohn L (2001) Resistance of *Amaranthus hybridus* to imazethapyr and chlormuron-ethyl. *Pesq Agrop Bras* 36:601–606.
-

-
- Tuesca D, Papa JC, Morichetti S (2013) *Amaranthus palmeri*, una maleza arribada a nuestro país desde el hemisferio norte. INTA, Centro Regional Santa Fe, Estación Experimental Agropecuaria Oliveros.
- Tuesca D, Papa JC, Morichetti S (2016) Manejo de malezas problema. *Amaranthus palmeri* (S.) Watson: Bases para su manejo y control en sistemas de producción. Red de conocimiento en malezas resistentes, ISSN N° 2250-5350, Volumen VI.
- Umbarger HE (1969) Regulation of the biosynthesis of the branched-chain amino acids. *Curr Top Cell Regul* 1:57–76.
- Umbarger HE (1978) Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem* 47:533–606.
- Upadhyaya M, Blackshaw R (2007) Non-chemical weed management: Principles, concepts and technology. CABI International, Wallingford. ISBN: 978-1-84593-290-9.
- Van Horn CR, Moretti ML, Robertson et al. (2018) Glyphosate resistance in *Ambrosia trifida*: Part 1. Novel rapid cell death response to glyphosate. *Pest Manag Sci* 74:1071–1078.
- VanGessel MJ (2001) Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. *Weed Sci* 49:703–705.
- Vencill WK, Nichols RL, Webster TM et al. (2012) Herbicide resistance: Toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. *Weed Sci* 60:2–30.
- Vereecken H (2005) Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Manag Sci* 61:1139–1151.
- Vieira BC, Samuelson SL, Alves GS, Gaines TA, Werle R, Krugger GR (2018) Distribution of glyphosate resistant *Amaranthus* spp. in Nebraska. *Pest Manag Sci* doi:10.1002/ps.4781
- Vila-Aiub MM, Balbi MC, Gundel PE, Ghersa CM, Powles SB (2007) Evolution of glyphosate-resistant johnsongrass (*Sorghum halepense*) in glyphosate-resistant soybean. *Weed Sci* 55:566–571.
- Vila-Aiub MM, Neve P, Powles SB (2009) Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytol* 184:751–767.
- Vila-Aiub MM, Balbi MC, Distéfano AJ et al. (2012) Glyphosate resistance in perennial *Sorghum halepense* (Johnsongrass), endowed by reduced glyphosate translocation and leaf uptake. *Pest Manag Sci* 68:430–436.
-

-
- Vila-Aiub MM, Gundel PE, Preston C (2015) Experimental methods for estimation of plant fitness costs associated with herbicide-resistance genes. *Weed Sci* 63:203–216.
- Wakelin AM, Lorraine-colwill DF, Preston C (2004) Glyphosate resistance in four different populations of *Lolium rigidum* is associated with reduced translocation of glyphosate to meristematic zones. *Weed Res* 44:453–459.
- Wakelin AM, Preston C (2006) A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. *Weed Res* 46:432–440.
- Walsh CT, Benson TE, Kim DH, Lees WJ (2006) The versatility of phosphoenolpyruvate and its vinyl ether products in biosynthesis. *Chem Biol* 3:83–91.
- Wang K (2006) *Agrobacterium* protocols (Vol. 2). Humana Press.
- Wang P, Lombi E, Zhao FJ, Kopittke PM (2016) Nanotechnology: A new opportunity in plant sciences. *Trends Plant Sci* 21:699–712.
- Ward SM, Webster TM, Steckel LE (2013) Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*): a review. *Weed Technol* 27:12–27.
- Wauchope R, Butler T, Hornsby A, Augustijn-Beckers P, Burt J (1992) The SCS/ARS/CES pesticide properties database: select values for environmental decision making. *Rev Environ Contam Toxicol* 123:1–164.
- Webster TM (2006) Weed survey – southern states. Vegetable, fruit and nut crops subsection. *Proc South Weed Sci Soc* 59:260–277.
- Weeks DP, Spalding MH, Yang B (2016) Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants. *Plant Biotechnol J* 14:483–495.
- Whaley CM, Wilson HP, Westwood JH (2006) ALS resistance in several smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*) biotypes. *Weed Sci* 54:828–832.
- Whaley CM, Wilson HP, Westwood JH (2007) A new mutation in plant ALS confers resistance to five classes of ALS-inhibiting herbicides. *Weed Sci* 55:83–90.
- Whitehead CW, Switzer CM (1967) The differential response of strains of wild carrot to 2,4-D and related herbicides. *Canadian J Plant Sci* 43:255–262.
- Wiersma AT, Gaines TA, Preston C et al. (2015) Gene amplification of 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-resistant *Kochia scoparia*. *Planta* 241:463–474.

-
- Wiersma PA, Schmiemann MG, Condie JA, Crosby WL, Moloney MM (1989) Isolation, expression and phylogenetic inheritance of an acetolactate synthase gene from *Brassica napus*. *Mol Gen Genet* 219:413-420.
- Woodburn A (2000) Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Manag Sci* 56:309–312.
- Woodworth AR, Rosen BA, Bernasconi P (1996) Broad range resistance to herbicides targeting acetolactate synthase (ALS) in a field isolate of *Amaranthus* sp. is conferred by a Trp to Leu mutation in ALS gene. *Plant Physiol* 111:1353.
- Weed Science Society of America Terminology Committee (1998) Resistance and tolerance definitions. *Weed Technol* 12:789. Disponible en <http://wssa.net/wssa/weed/resistance/herbicide-resistance-and-herbicide-tolerance-definitions/>
- Wu C, Davis AS, Tranel PJ (2018) Limited fitness costs of herbicide-resistance traits in *Amaranthus tuberculatus* facilitates resistance evolution. *Pest Manag Sci* 74:293–301.
- Wuerffel RJ, Young JM, Lee RM et al. (2015) Distribution of the Δ G210 protoporphyrinogen oxidase mutation in illinois waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) and an improved molecular method for detection. *Weed Sci* 63:839–845.
- Yao Q, Cong L, Chang JL, Li KX, Yang GX, He GY (2006) Low copy number gene transfer and stable expression in a commercial wheat cultivar via particle bombardment. *J Exp Bot* 57:3737–3746.
- Yao Q, Cong L, He G, Chang J, Li K, Yang G (2007) Optimization of wheat co-transformation procedure with gene cassettes resulted in an improvement in transformation frequency. *Mol Biol Rep* 34:61–67.
- Yu Q, Cairns A, Powles SB (2007) Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta* 225:499–513.
- Yu Q, Han H, Vila-Aiub MM, Powles SB (2010) AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth. *J Exp Bot* 61:3925–3934.
- Yu Q, Han H, Li M et al. (2012) Resistance evaluation for herbicide resistance-endowing acetolactate synthase (ALS) gene mutations using *Raphanus raphanistrum* populations homozygous for specific ALS mutations. *Weed Res* 52:178–186.

-
- Yu Q, Ahmad-hamdani MS, Han H, Christoffers MJ, Powles SB (2013) Herbicide resistance-endowing ACCase gene mutations in hexaploid wild oat (*Avena fatua*): insights into resistance evolution in a hexaploid species. *Heredity* 110:220–231.
- Yu Q, Powles SB (2014) Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. *Pest Manag Sci* 70:1340–1350.
- Yu Q, Jalaludin A, Han H, Chen M, Sammons RD, Powles SB (2015) Evolution of a double amino acid substitution in the EPSP synthase in *Eleusine indica* conferring high level glyphosate resistance. *Plant Physiol* 167:1440–1447.
- Yuan JS, Abercrombie LLG, Cao Y et al. (2010) Functional genomics analysis of horseweed (*Conyza canadensis*) with special reference to the evolution of non-target-site glyphosate resistance. *Weed Sci* 58:109–117.